

Visualisierung und Charakterisierung der S-Protein vermittelten Fusion von Coronaviren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

Eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Patricia Eifart

geb. am 17.01.1979 in Greifswald, Deutschland

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Herrmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Pomorski

3. Gutachter: PD Dr. M. Veit

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2007

Zusammenfassung

Visualisierung und Charakterisierung der S-Protein vermittelten Fusion von Coronaviren

117 Seiten, 39 Abbildungen und 21 Tabellen, Patricia Eifart, 2007, Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Dissertation

Die Infektion von Zellen durch das Coronavirus MHV-A59 setzt die Freisetzung des viralen Genoms nach Fusion mit der zellulären Targetmembran voraus. Die Fusionsreaktion wird vom viralen S-Protein vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Eintrittsweg von MHV-A59 in Mauszellen mit zwei unabhängige experimentellen Ansätzen untersucht. Die Infektivität konnte durch lysosomotrope Substanzen und Inhibitoren der Clathrin-abhängigen Endozytose signifikant gehemmt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass der Eintritt von MHV-A59 in Mauszellen über die Clathrin-abhängige Endozytose erfolgt und die anschließende Fusion der viralen und zellulären Membran in einem intrazellulären Kompartiment mit niedrigem pH-Wert stattfindet. Durch Inhibitoren endosomaler Proteasen dagegen wurde die Infektivität nur leicht beeinträchtigt. Epifluoreszenz- und konfokalmikroskopische Studien zur Interaktion fluoreszenzmarkierter MHV-A59 Partikel mit Mauszellen konnten nachweisen, dass MHV-A59 über Endozytose aufgenommen wird. Die Färbung intrazellulärer Kompartimente lässt die Fusion von viraler und zellulärer Membran vermuten. Nach Bindung der Viren an die Zellen und anschließende Erniedrigung des pH-Wertes auf 5,0, welcher das Milieu endosomaler Organellen simuliert, wurde eine deutliche Färbung der Plasmamembran beobachtet. Unter neutralen pH-Bedingungen konnte dagegen keine Markierung der Plasmamembran beobachtet werden. Die Erniedrigung des pH-Werts in Abwesenheit des Rezeptors führte ferner zu einer irreversiblen Konformationsumwandlung im viralen Fusionsprotein, die zur Inaktivierung der Fusionsaktivität und zum Verlust der Infektivität führte. Diese Reaktion konnte kryoelektronen- und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Beteiligung des endozytotischen Weges für den viralen Eintritt von MHV-A59 hin und lassen vermuten, dass ein niedriger pH-Wert, bereitgestellt durch ein zelluläres endosomales Kompartiment, die Konformationsänderung im S-Protein induziert und somit die Fusionsreaktion auslöst. Die kryoelektronenmikroskopische Analyse und 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59 in der natürlichen Umgebung der viralen Hüllmembran führte zur Erstellung eines vorläufigen 3D-Modells der nativen S-Protein Konformation.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Struktur und Fusionsfähigkeit des S-Proteins von SARS-CoV analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass das S-Protein von SARS-CoV als Trimer sezerniert wird. Zusätzlich wurde ein auf Fluoreszenzmikroskopie basierender Zell-Zell-Fusionsassay etabliert. Dieser konnte nachweisen, dass die Zell-Zell-Fusion zwischen S-Protein und ACE2-exprimierenden Zellen sowohl abhängig vom pH-Wert als auch von der proteolytischen Spaltung in S1- und S2-Untereinheit ist und durch Erniedrigung des pH-Wertes zusätzlich verstärkt werden kann. Die genaue Rolle des niedrigen pH-Wertes bei der Konformationsumwandlung und/oder einer Aktivierung endosomaler Proteasen bedarf weiterer Untersuchungen.

Im abschließenden Teil der Arbeit wurde auf der Basis vergleichender theoretischer Untersuchungen eine Vorhersage des mutmaßlichen Fusionspeptids des S-Proteins von MHV-A59, welches alle wesentlichen Merkmale eines internen Fusionspeptids aufweist, vorgenommen. Es liegt nahe der „Heptad-Repeat“ (HR) Domäne HR1. Experimentelle Ansätze bleiben jedoch unabdinglich, um das Fusionspeptid, insbesondere in bezug auf dessen Vermittlung der Fusion, näher zu charakterisieren.

Schlüsselwörter: Coronavirus, MHV-A59, Zelleintritt, SARS-CoV, Fusionsprotein, 3D-Struktur, Spikeprotein, Fusion, Fluoreszenzmikroskopie, Konformationsumwandlung, Endozytose

Abstract

Analysis of S-Protein mediated Fusion of Coronaviruses

117 pages, 39 Figures and 21 Tables, Patricia Eifart, 2007, Berlin, Humboldt University Berlin, Dissertation

Infection by the coronavirus mouse hepatitis virus (MHV)-A59 requires the release of the viral genome by fusion with the respective target membrane of the host cell. Fusion is mediated by the viral S-protein. Here, the entry pathway of MHV-A59 into murine cells was studied by mainly two independent approaches. Infection of cells assessed by the plaque reduction assay was strongly inhibited by lysosomotropic compounds and substances which interfere with clathrin-dependent endocytosis, suggesting that MHV-A59 is taken up via endocytosis and delivered to acidic endosomal compartments. Infection was only slightly reduced in the presence of substances inhibiting endosomal proteases. Fluorescence confocal microscopy of labeled MHV-A59 confirmed that the virus is taken up via endocytosis. Bright labeling of intracellular compartments suggests their fusion with the viral envelope. No fusion with the plasma membrane was observed under neutral pH conditions. However, when virus was bound to cells and the pH was lowered to 5.0, we observed a strong labeling of the plasma membrane. Electron microscopy revealed low pH triggered conformational alterations of the S-ectodomain. Very likely, these alterations are irreversible because low pH-treatment of viruses in the absence of target membranes caused an irreversible loss of the fusion activity. The results imply that endocytosis plays a major role in MHV-A59 infection and that the acidic pH of the endosomal compartment triggers a conformational change of the S-protein mediating fusion. Furthermore different conformations of the trimeric spike protein of the murine hepatitis virus A59 in its native environment, the viral envelope, were characterized by cryoelectron and electron microscopy. A preliminary 3D-reconstruction of the native structure at room temperature and neutral pH could be accomplished.

Besides we studied the structure and fusion capability of the spike protein expressed by SARS-CoV. The accomplished data indicate that the spike glycoprotein is secreted as a trimer. Furthermore a cell-cell fusion assay based on fluorescence microscopy was established. The fusion of spike protein and ACE2-receptor expressing cells was strongly dependent on low pH and on proteolytic cleavage of the S-protein into S1 and S2 subunit, whereas fusion could be significantly increased by lowering of the pH. Nevertheless, the precise function of low pH in either induction of the conformational change or activation of the respective endosomal protease and/or a combination of both is not unveiled yet and has to be investigated in more detail.

The final theoretical part of this thesis allowed the identification of the putative fusion peptide, which showed the main characteristics of internal fusion peptides. It is located near the HR1 region and allows the heptad regions of the spike protein to assemble in the six-helix bundle structure (6HB). This structure is of great importance to initiate the approximation of viral and cellular membrane and thus to induce fusion. However, future experiments are indispensable to characterize the main features and to elucidate the particular role of the fusion peptide in fusion mediation.

Keywords: Coronavirus, MHV-A59, Cell Entry, SARS-CoV, fusion protein, 3D structure, S protein, Fusion, Fluorescence Microscopy, Conformation, Endocytosis

Abkürzungen	7
A. Einleitung	10
A.1 Wege des viralen Eintritts.....	10
A.1.1 Der Clathrin-abhängige virale Eintritt.....	12
A.1.2 Der Clathrin-unabhängige virale Eintritt.....	14
A.1.3 Identifizierung des viralen Eintrittswegs	15
A.2 Virale Fusionsproteine.....	17
A.2.1 Aktivierung der Fusion durch niedrigen pH-Wert.....	21
A.2.2 Aktivierung der Fusion durch Rezeptorinteraktion.....	22
A.2.3 Die Zwei-Schritt Aktivierung des Alpharetrovirus	23
A.3 Virale Fusionspeptide	24
A.3.1 N-terminale Fusionspeptide.....	25
A.3.2 Interne Fusionspeptide	26
A.3.3 Die Rolle viraler Fusionspeptide während der Fusion	26
A.4 Coronaviren	27
A.4.1 Aufbau und Replikation von Coronaviren	27
A.4.2 Der virale Eintritt von MHV-A59.....	30
A.4.3 Das S-Protein von Coronaviren	31
A.4.4 Das Fusionspeptid der Coronaviren	34
B. Zielsetzung.....	36
C. Material und Methoden	37
C.1 Chemikalien und Lösungen.....	37
C.2 Biologisches Material	38
C.2.1 Viren.....	38
C.2.2 Zellen	38
C.2.3 Bakterien.....	38
C.3 Eukaryotische Zellkultur	39
C.3.1 Passagieren eukaryotischer Zellen	39
C.3.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	39
C.4 Molekularbiologie	40
C.4.1 Bakterienkultur	40

C.4.2	Transformation von Bakterien.....	40
C.4.3	Aufreinigung der Plasmide.....	41
C.4.4	Konzentrationsbestimmung und Reinheitsgrad aufgereinigter DNA.....	41
C.4.5	Klonierung der Plasmid-DNA.....	42
C.5	Expression rekombinanter Proteine im eukaryotischen Zellsystem	42
C.5.1	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	43
C.5.2	Expression, Isolierung und Analyse der Proteine.....	44
C.5.3	SDS-PAGE und Native Gelelektrophorese	45
C.5.4	Westernblotanalyse	45
C.6	Viruszucht.....	46
C.6.1	Zucht von Influenzaviren.....	46
C.6.2	Zucht von MHV	47
C.6.3	Zucht von VSV	47
C.7	Virusaufreinigung	47
C.7.1	Aufreinigung des Influenzavirus.....	47
C.7.2	Aufreinigung der Maushepatitisviren und Isolierung des S-Proteins.....	48
C.8	Herstellung von SUV mit Ni-Lipiden	49
C.9	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	49
C.9.1	Kryoelektronenmikroskopie	49
C.9.2	Elektronenmikroskopie an negativkontrastierten Proben	50
C.9.3	Rechnergestützte Bildverarbeitung nach der Einzelpartikelmethode.....	50
C.10	Plaqueassay und Plaquereduktionsassay.....	51
C.11	Charakterisierung und Analyse der Fusion von Coronaviren	52
C.11.1	Herstellung von Erythrozytenghost.....	52
C.11.2	Markierung der Viren	53
C.11.3	Fusionsmessungen.....	53
C.12	Mikroskopie	54
C.12.1	Epifluoreszenzmikroskopie	54
C.12.2	Konfokalmikroskopie.....	54
C.13	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Fusion von SARS-CoV	55

C.13.1	Überprüfung der Oberflächenexpression des S-Proteins von SARS-CoV und des humanen Rezeptors hACE2	55
C.13.2	Kultur der Zellen	55
C.13.3	Markierung der Zellen.....	56
C.13.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Fusion.....	56
C.14	Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59.....	57
D.	Ergebnisse	58
D.1	Expression und Isolierung des S-Proteins von SARS-CoV und des humanen Rezeptors hACE2.....	58
D.1.1	Optimierung der Expressionsbedingungen	58
D.1.2	Expression und Aufreinigung des S-Proteins von SARS-CoV	59
D.1.3	Klonierung und Expression der Volllängenvariante des S-Proteins von SARS-CoV mit myc-(His) ₆ -Tag	61
D.1.4	Expression verschiedener Varianten des ACE2-Rezeptorproteins.....	63
D.2	Isolierung und Aufreinigung von MHV-A59	64
D.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen des S-Proteins von Coronaviren	67
D.3.1	Elektronenmikroskopische Untersuchungen des S-Proteins von SARS-CoV	67
D.3.2	Elektronenmikroskopische Analyse des S-Proteins von MHV-A59.....	68
D.4	Identifizierung des Infektionsweges von MHV-A59	71
D.4.1	Die Infektivität von MHV-A59 kann durch lysosomotrope Substanzen und Inhibitoren der Endozytose gehemmt werden	71
D.4.2	Proteaseinhibitoren haben keinen Einfluss auf die Infektivität von MHV-A59.....	74
D.5	Charakterisierung der Fusionsaktivität von MHV-A59 und SARS-CoV.....	74
D.5.1	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Fusion von MHV-A59	75
D.5.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Fusion von MHV-A59	76
D.5.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Fusionseigenschaften von SARS-CoV	79
D.6	Irreversibilität der Konformationsumwandlung des S-Proteins von MHV-A59	83
D.7	Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59.....	85
D.7.1	Die Sequenz und Primärstruktur des Spikeproteins von MHV-A59	85
D.7.2	Analyse der Aminosäuresequenz des S-Proteins von MHV-A59.....	86
D.7.3	Die Lage der möglichen Fusionspeptide im S-Protein von MHV-A59.....	90

E.	Diskussion	93
E.1	Identifizierung des Infektionsweges von Coronaviren	94
E.2	Die Struktur des S-Proteins von Coronaviren.....	98
E.2.1	Das S-Protein von SARS-CoV.....	98
E.2.2	Die S-Protein-vermittelte Fusion von SARS-CoV	101
E.3	Das S-Protein von MHV-A59.....	102
E.3.1	3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59.....	102
E.3.2	Konformationen des S-Proteins von MHV-A59	105
E.4	Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59.....	107
E.5	Ausblick	108
	Literaturverzeichnis	110

Abkürzungen

3D	dreidimensional
Å	Ångström (0.1 nm)
Abb.	Abbildung
ACE2	Angiotensin-Converting-Enzyme 2; Angiotensin konvertierendes Enzym 2
AK/AB	Antikörper
AM	Acetoxymethyl
AS	Aminosäure
ASLV	Avianer Sarkoma-Leukosis Virus
BHA	durch Bromelain gespaltene Ektodomäne des Hämagglutinins
BSA	Rinderserumalbumin
Calcein-AM	Acetomethylester des Calceins
CEACAM	Carcinoembryones Zelladhäsionsmolekül
CMTMR	(5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino) Tetramethylrhodamin
CoV	Coronavirus
CT	cytoplasmatische (Domäne)
DF	DreamFect™ Transfektionsreagenz
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Envelope (Hüll) Protein
EboV	Ebolavirus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetales Kälbserum
FDQ	Fluoreszenzdequenching
FP	Fusionspeptid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Golgi-Apparat
GP	Glykoprotein
HA	Hämagglutinin
HE	Hämagglutinin-Esterase
HIV	Humanes-Immundefizientes-Virus
HN	Hämagglutinin-Neuraminidase
HR	“Heptad Repeat“-Sequenz
HRP	Horseradish-Peroxidase – Meerrettich-Peroxidase
HRSV	Humanes Respiratorisches Syncytialvirus
HSV	Herpes Simplex Virus
IBV	Infektiöser Bronchitis Virus
IF	Interfazial
IFH	Interfazialer Hydrophobizitätsplot
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
Lyso-PC	Lysophosphatidylcholin
M	Matrixprotein

MHV	Maushepatitisvirus
min	Minuten
mind.	mindestens
MM	Molmarker
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	Multiplicity of Infection, Multiplizität der Infektion
MT	Mikrotubuli
MVB	Multivesicular Bodies; Multivesikuläre Endosomen
MW	Molecular Weight – Molekulargewicht
N	Nukleokapsid
NA	Neuraminidase
NaAc	Natriumacetat
NDV	Newcastle Disease Virus
Nr.	Nummer
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline: Phosphatpuffer
PBS+	Phosphatpuffer mit 2 mM Ca ²⁺ und 2 mM Mg ²⁺
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PF	PolyFect
PFU	Plaque forming unit
p.i.	Postinfektion/Postinokulation
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PRA	Plaquereduktionsassay
PTA	Phospho-Tungstic-Acid – Phosphorwolframsäure
R18	Octadecylrhodamin-B-chlorid
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
S	Spikeprotein
S1	S1-Untereinheit des S-Proteins, Kopffdomäne
S2	S2-Untereinheit des S-Proteins, Stammdomäne
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome; Schweres Akutes Atemwegssyndrom
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec.	Sekunden
SFV	Semlikiforestvirus
SIV	Simian-Immundefizientes-Virus
SP	Signalpeptid
SUV	Small unilamellar vesicle: kleine unilamellare Lipidvesikel
Tab.	Tabelle
TBEV	Tick-Borne-Encephalitis Virus
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Temp.	Temperatur
TM	Transmembrandomäne
TPCK	L-1-Tosylamido-2-Phenylalanyl Chloromethyl Keton

Ü	Überstand
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UZ	Ultrazentrifuge
VSV	Vesikulärerstomatitisvirus
VV	rekombinantes Vakziniavirus VTF7.3
WWIH	Wimley & White Interfazialer Hydrophobizität

A. Einleitung

Die Fusion von Membranen spielt in allen biologischen Systemen eine essentielle Rolle. Beim Austausch genetischer Informationen und ihrer Reassemblierung müssen zum Beispiel Spermium und Eizelle fusionieren. Auch in anderen biologischen Systemen wie dem neuronalen Netzwerk ist es essentiell Informationen auszutauschen. Dies geschieht über synaptische Vesikel, die an der Zielmembran fusionieren müssen, um ihre Botenstoffe freisetzen zu können. Membranfusion spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Myogenese. Es entstehen vielkernige Synzytien, die sich anschließend in Skelettmuskelzellen differenzieren.

Insbesondere für umhüllte Viren ist die Fusion mit der Membran der Zielzelle von großer Bedeutung für deren Replikation. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, ähnlich denen der Plasmamembran der Wirtszelle. Durch Verschmelzung beider Membranen wird es dem Virusgenom ermöglicht in die Zelle einzudringen und sich hier zu replizieren, um neue Viruspartikel zu erzeugen. Die Membranfusion wird über virusexprimierte Glykoproteine, welche in der Hüllmembran verankert sind, vermittelt. In diesem Zusammenhang können nicht-pathogene Viruspartikel als Träger fremder genetischer Informationen dienen, die immer häufiger in der Gentherapie Verwendung finden. Dazu ist es wichtig den Mechanismus der virusvermittelten Zellfusion vollständig aufzuklären. Ein weiterer Punkt ist die Aufklärung dieses Mechanismus, um pathogene Viren wie Influenza, SARS oder HIV therapieren zu können und geeignete Gegenmittel zu entwickeln, die die Fusion verhindern oder in einem bestimmten Stadium stoppen können.

A.1 Wege des viralen Eintritts

Ein kritischer Punkt bei der viralen Infektion ist die Fähigkeit des Virus, das virale Genom von einem infizierten zu einem nicht-infizierten Organismus oder von einer infizierten zu einer nicht-infizierten Zelle zu transferieren. Durch die Unfähigkeit sich selbständig zu replizieren und durch das Defizit eines eigenen Metabolismus sind Viren von ihrem Wirt/Wirtszelle abhängig. Für eine erfolgreiche Vermehrung und Verbreitung des viralen Genoms haben Viren verschiedenste Strategien entwickelt, um in die Zelle einzudringen, ohne vom Wirt erkannt und vernichtet zu werden. Die effektive Nutzung der zellulären Wege bildet die Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion. Viren sind darüber hinaus ein wichtiges Instrument zur Aufklärung verschiedener zellulärer Transportprozesse und -wege. Sie können zum einen als Gentransfervehikel benutzt werden, um spezielle Gene/RNA, siRNA oder Proteine in die Zielzelle einzubringen. Zum anderen können sie Aufschluss über die Protein-Proteininteraktion und die anschließende Signaltransduktionskaskade und Fusion geben [1]. Bei allen bekannten Viren erfolgt die Freisetzung des viralen Nukleokapsids zunächst ins Cytosol der Zelle, unabhängig davon ob das Virus den Weg des direkten Eintritts oder den endozytotischen Weg nutzt. Die meisten RNA-Viren

replizieren an definierten Organellen im Cytosol der Zelle [2] , wogegen DNA-haltige Viren ihr Genom zunächst in den Nukleus einschleusen müssen.

Derzeit gibt es Hinweise auf sechs verschiedene Wege des viralen Eintritts (Abbildung 1). Dazu gehört die Makropinozytose (A). Über diesen Weg treten Adenoviren in die Zelle ein, der Clathrin-unabhängige Weg (B), der eine Fusion der viralen Membran mit der Plasmamembran unter neutralen pH-Bedingungen voraussetzt. Dieser wird unter anderem von HIV, Influenza- (ca. 40%) und Arenaviren genutzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Wege des viralen Eintritts

Clathrin-unabhängig	Clathrin-abhängig
Umhüllte Viren	
HSV-1	Influenza
Sendaivirus	Coronaviren: SARS-CoV**, MHV-2**
HIV	Ebola Virus (EboV)**
Influenza	ASLV/ALV***
	VSV
	SFV
Nicht-umhüllte Viren	
Picornaviren – Poliovirus*	Reoviren**
Polyomaviren	
SV40	

*[3] ; **SARS-CoV, Ebola, MHV-2 und Reoviren: Proteolytische Spaltung der viralen Glykoproteine im sauren Milieu des Endosoms [4, , 5, , 6] ; ***ASLV/ALV: Rezeptor-Bindung und Erniedrigung des pH [7] .

Der Clathrin-abhängige Weg ist der am häufigsten genutzte Aufnahmeweg für Viren (Abbildung 1 C, Tabelle 1). Die Viren gelangen über frühe Endosomen, aus denen sich späte Endosomen entwickeln, schließlich zu den Lysosomen. Abhängig vom Auslöser der Fusion kann an jeder Stelle dieses Weges die Freisetzung des viralen Genoms in das Cytoplasma erfolgen. Der Caveolin-abhängige Weg (D) ist Cholesterol-abhängig und über den Viren wie SV40 [8] , Coxsackie-B, Mauspolyoma- und Echo-1 Viren zum Caveosom transportiert werden und anschließend über einen weiteren vesikulären Transportschritt zum ER gelangen und dort in das Cytosol entlassen werden. Ein weiterer Cholesterol-abhängiger, aber Caveolin- und Clathrin-unabhängiger Weg (E) wird von Polyomaviren und SV40 genutzt, um die Zielzelle zu infizieren. Die letzte bekannte Möglichkeit des viralen Eintritts stellt der Dynamin-2-abhängige Weg (F) dar, der ebenfalls Caveolin-abhängig ist und einen anschließenden Transport des Virus zum Caveosom beinhaltet. Dieser wird vom Echo-1 Virus genutzt.

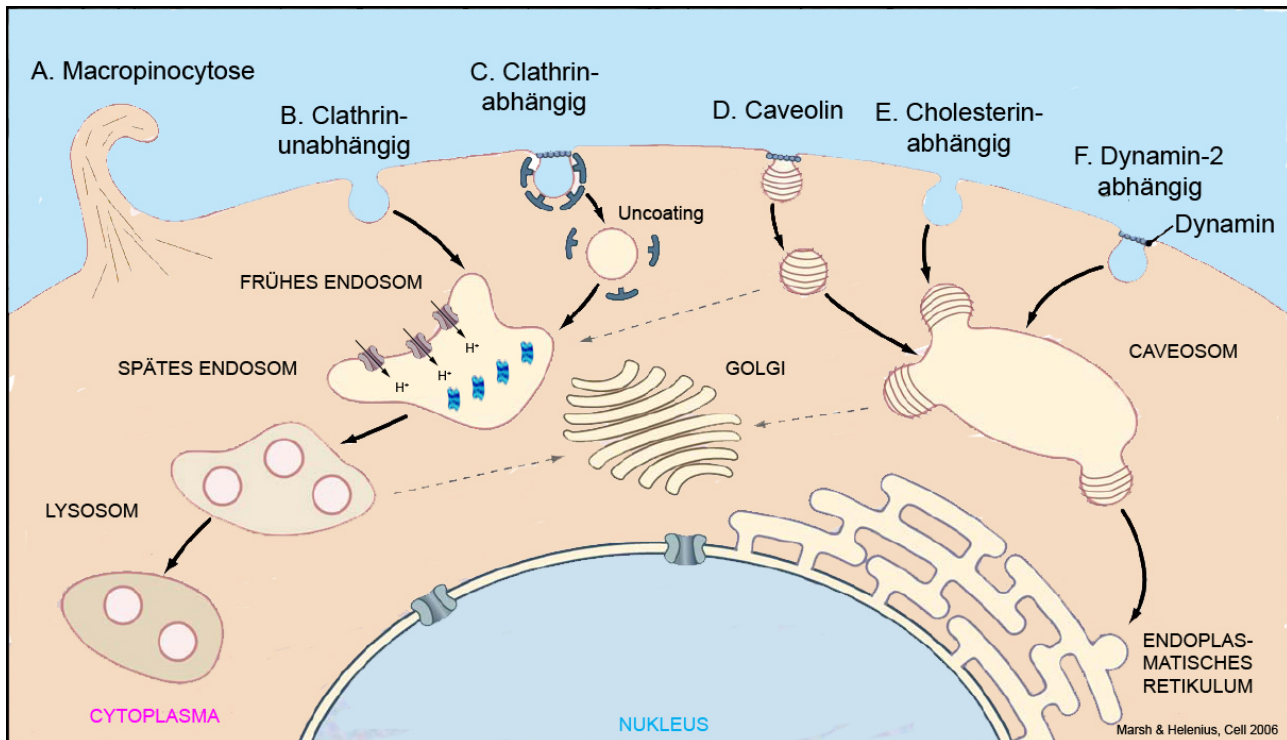


Abbildung 1: Wege des viralen Eintritts [1] . (A) Makropinozytose. (B) Clathrin-unabhängiger, direkter Eintritt nach Fusion mit der Plasmamembran (PM). (C) Clathrin-abhängiger Weg über frühe und späte Endosomen zu Lysosomen. (D) Caveolin-abhängiger, Cholesterin-abhängiger Weg mit anschließendem Transport zum Caveosom und ER. (E) Cholesterin-abhängiger, Caveolin- und Clathrin-unabhängiger Weg mit anschließendem Transport zum Caveosom und ER. (F) Dynamin-2-abhängiger, Caveolin-abhängiger Weg mit Transport zum Caveosom und ER.

Abhängig von Zelltyp und Virus kann die Freisetzung des viralen Nukleokapsids an fünf verschiedenen Orten stattfinden: (1) der Plasmamembran, (2) dem frühen oder (3) späten Endosom, (4) dem Caveosom oder (5) dem ER. Die Phagozytose konnte bis jetzt nicht mit dem viralen Eintritt in Verbindung gebracht werden und wurde daher nicht berücksichtigt [1] .

A.1.1 Der Clathrin-abhängige virale Eintritt

Betrachtet man das gesamte Spektrum der Viren, so ist zu beobachten, dass der Großteil über die endozytotische Internalisierung in die Zielzelle gelangt. Die Vorteile sind offensichtlich. Durch den Transport in endozytotischen Vesikeln ist es dem Virus möglich, tief in das Cytoplasma der Zelle einzudringen, dadurch den größten zellulären Barrieren wie dem Cytoskelett und cytosolischen Proteinen auszuweichen [9] und die molekularen Motoren der Zelle zu nutzen [10] . Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass während der Phase der Freisetzung noch keinerlei virale Proteine auf der Oberfläche der Zielzelle präsentiert werden und so eine Erkennung durch das Immunsystem des Wirtsorganismus nahezu ausgeschlossen ist. Die Clathrin-abhängige Endozytose ist ein kontinuierlicher Prozess und stellt für das Virus einen schnellen und effizienten Weg dar, in die Zelle zu gelangen [11] . Schon nach einigen Minuten kommt es zur Internalisierung des Virus und

die anschließende pH-Erniedrigung ermöglicht die über virale Glykoproteine vermittelte rasche Verschmelzung von viraler und intrazellulärer Membran, um das virale Nukleokapsid in das Cytosol zu entlassen. Abhängig vom pH-Wert, erfolgt die Freisetzung entweder vom frühen Endosom bei einem pH-Wert von 6.5-6.0 oder vom späten Endosom bei pH 6.0-5.5. Für das Ebolavirus, SARS-CoV, MHV-2 und die nicht-umhüllten Reoviren ist ein niedriger pH-Wert allein nicht ausreichend, um die Fusion auszulösen. Zusätzlich muss eine proteolytische Spaltung der viralen Glykoproteine, ausgelöst durch die Proteasen Cathepsin L oder B, im Lumen des Endosoms stattfinden, um das virale Protein in einen fusionskompetenten Zustand zu versetzen. Für das aviane Leukosevirus (ASLV) ist neben der pH-Erniedrigung die Interaktion mit dem Rezeptor notwendig, um die Fusion auszulösen [7, , 12, , 13]. Bei Influenza A Viren findet man für ca. 40% der Partikel neben dem klassischen Eintritt der Clathrin-abhängigen Aufnahme auch den Clathrin-unabhängigen Weg [14]. Nur 5% der Viren assoziieren mit bereits bestehenden Clathrindomänen. Erst die Virusbindung induziert eine Assemblierung Clathrin-reicher Domänen unter der Plasmamembran. Diese Induktion- und Rekrutierungsreaktion für Clathrin wurde auch für das Semlikiforestvirus (SFV) und Reoviren beobachtet [15]. Endozytotische Clathrin-assoziierte Vesikel liefern ihren Inhalt an frühe Endosomen und es gibt Hinweise darauf, dass diese zu einer selektiven, spezifischen Population von Endosomen gehören [16]. Für das Vesikularstomatitisvirus (VSV) konnte gezeigt werden, dass die Fusion der viralen Membran mit Membranen der multivesikulären Endosomen (MVB) erfolgt und diese anschließend mit der Membran später Endosomen weiter verschmelzen [17]. In diesem Fall ist für die Entlassung des viralen Nukleokapsids die Fusion mit zwei zellulären Membranen Voraussetzung. Ein solcher Mechanismus konnte auch für das Anthraxtoxin des *Bacillus Anthracis* nachgewiesen werden [18].

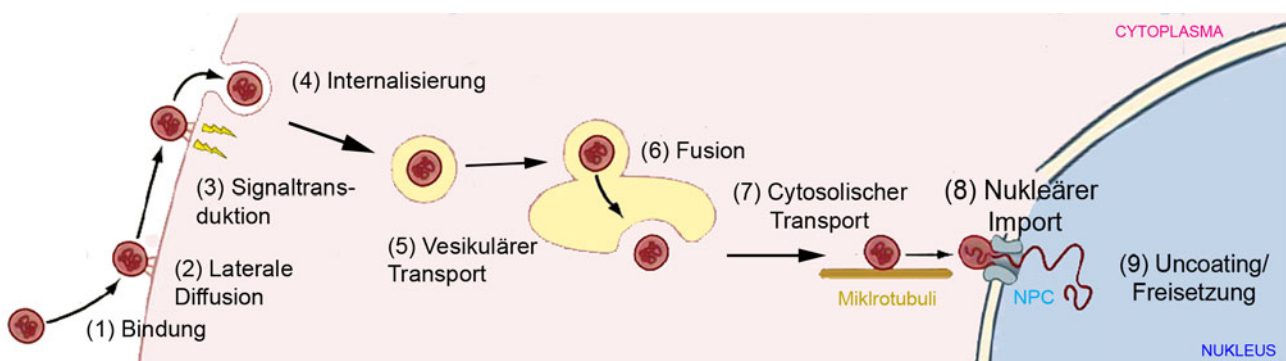


Abbildung 2: Der endozytotische virale Eintritt in die Zelle [1]. Neun Schritte des viralen Eintritts werden bis zur Freisetzung des Nukleokapsids durchlaufen. In diesem Beispiel wird das virale Nukleokapsid in den Nukleus transportiert.

Die einzelnen Schritte des endozytotischen viralen Eintritts stellen sich wie folgt dar: Der erste Kontakt zwischen Virus und Zelle erfolgt durch die Interaktion viraler Strukturproteine mit den Oberflächenproteinen der Zelle. Dies können Rezeptoren oder andere zelluläre Faktoren sein (Abbildung 2 (1)). Anschließend kommt es zur lateralen Diffusion des Virus-Rezeptor-Komplexes (2), welche eine Signaltransduktionskaskade (3) auslöst. Diese führt zur Internalisierung des Virus (4). Nach dem vesikulären Transport (5) werden die Viruspartikel zu zellulären Kompartimenten, wie Endosom, ER oder Caveosom transportiert und Konformationsumwandlungen in den viralen Oberflächenproteinen führen zur Fusion der viralen und zellulären Membranen (6). Dies ermöglicht die Freisetzung des Nukleokapsids in das Cytosol. Umhüllte Viren nutzen für diesen Vorgang die Membranfusion, wogegen nicht-umhüllte Viren durch Lyse oder Porenbildung in die Zelle eindringen. Nach gerichtetem intrazellulärem Transport entlang von Mikrotubulis (MTs) (7) findet der Import des viralen Genoms in den Zellkern statt (8), indem das Kapsid an den Nukleären Zellkernporenkomplex (NPC) bindet und das virale Genom freigesetzt wird (Abbildung 2 (9)). Die Freisetzung des viralen Genoms kann auch im Cytosol und assoziiert mit intrazellulären Membranen stattfinden.

A.1.2 Der Clathrin-unabhängige virale Eintritt

Das am intensivsten untersuchte Virus für den Clathrin-unabhängigen, Caveolin-/Raft-abhängigen Weg ist das SV40-Virus. SV40 ist ein nicht-umhülltes Virus, des DNA als genetischen Informationsträger enthält [19, , 20, , 21] . Der Caveolae/Raft-abhängige Weg untergliedert sich in drei ähnliche Varianten (Abbildung 1 D-F). Zunächst wird die Mehrheit der internalisierten Viren zu einem pH-neutralen Kompartiment, dem Caveosom transportiert (Abbildung 1 D). Anschließend werden die virushaltigen Vesikel mit Hilfe der Mikrotubuli zum ER transportiert, wo die Freisetzung des Nukleokapsids stattfindet [8] . Auch Echo-1 und Coxsackie-B Viren nutzen diese Route [22, , 23] . Zusätzlich zu diesen Wegen gibt es immer mehr Hinweise auf einen Clathrin-unabhängigen Weg, der zum endosomalen System gerichtet ist (Abbildung 1 B). Dieser konnte sowohl für Arenaviren als auch für Influenzaviren beobachtet werden [14, , 24] .

Die direkte Fusion des Virus mit der Plasmamembran findet unter neutralen pH-Bedingungen statt. Vergleicht man den pH-unabhängigen mit dem pH-abhängigen Weg, wird offensichtlich, dass beim direkten Eintritt und nach Fusion mit der Plasmamembran das Nukleokapsid zunächst das Cytoskelettnetzwerk aus Aktin-, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli (MT) durchdringen muss, um seinen Bestimmungsort zu erreichen. Da die virale Replikation immer im oder in der Nähe des Nukleus stattfindet, ist ein Transport bis zu diesem Organell unabdinglich. Der direkte Eintritt besitzt allerdings auch Vorteile. Zum einen ist die Gefahr des proteolytischen Abbaus durch den gerichteten Transport in endosomalen Vesikeln zu den Lysosomen sehr gering. Zum anderen

werden während der Virusreplikation nicht benötigte virale Glykoproteine an die Oberfläche der infizierten Zelle transportiert. Die Zellen können unter diesen Bedingungen mit der Nachbarzelle fusionieren. Dieser Vorgang wird als Zell-Zell-Fusion bezeichnet, bei der es zur Ausbildung von Synzytien - vielkernigen Zellkomplexen - kommt. Der schnelle Transfer viraler genetischer Information ist so ohne die Bildung von Viruspartikeln möglich. Zellverbände und Gewebe können auf diese Art besonders schnell und effizient infiziert werden. Für die Infektion weiterer Organismen und die Verbreitung der viralen genetischen Information ist es jedoch unablässig Viruspartikel zu bilden.

A.1.3 Identifizierung des viralen Eintrittswegs

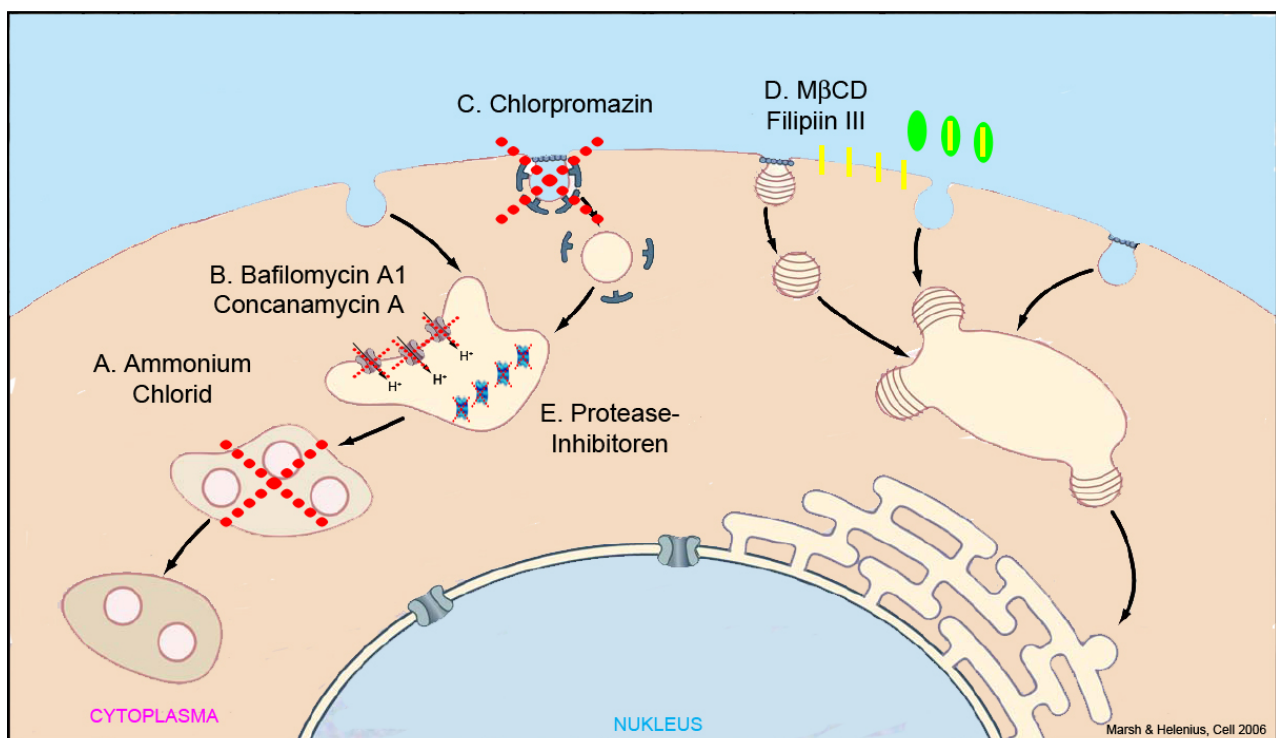
Die Infektivität ist von zwei Faktoren abhängig. Einerseits wird das Infektionsverhalten durch das Virus selbst und andererseits durch den infizierten Zelltyp bestimmt. Zur Untersuchung und Identifizierung des viralen Eintrittsweges werden u.a. Inhibitoren der Endozytose eingesetzt, um diesen Weg zu inhibieren. Wird die Zelle dennoch infiziert und kommt es zur Produktion von Viruspartikeln, so kann davon ausgegangen werden, dass eine Infektion unabhängig von der endozytotischen Route stattfindet. Die Substanzen, die eine Ansäuerung bestimmter Zellorganellen verhindern, werden als lysosomotrope Agenzien bezeichnet. Zur Identifizierung des viralen Eintrittsweges und zur Charakterisierung der anschließenden Fusion und Art der zellulären Membran wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 2 zusammengefassten Substanzen verwendet. Neben den lysosomotropen Substanzen, die die Ansäuerung endozytotischer Vesikel auf verschiedene Weise verhindern, sind auch weitere Inhibitoren, die endosomale Proteasen hemmen oder Cholesterol-entziehende Reagenzien bekannt, die einen Einfluss auf die Infektivität bestimmter Viren haben.

Tabelle 2: Inhibitoren der Endozytose und andere Substanzen

Substanz	Konzentration	Literatur
Lysosomotrope Substanzen		
Ammoniumchlorid	10-50 mM	[5, , 25, , 26, , 27, , 28, , 29, , 30, , 31, , 32, , 33, , 34, , 35]
Bafilomycin A1	20 – 100 nM	[25, , 27, , 28, , 29, , 31, , 36, , 37, , 38, , 39, , 40, , 41, , 42, , 43]
Chlorpromazin	10-14 µM	[26, , 38, , 44, , 45, , 46, , 47]
Concanamycin A	10-100 nM	[41]
Monensin	1-10 µM	[27, , 28, , 40, , 48, , 49]
Proteaseinhibitoren		
E-64	1-10 µM	[4, , 5, , 6]
Leupeptin	1-10 µg/ml	[4, , 5, , 50, , 51]

Cholesterolentzug/-bindung		
Filipin III	1-15 µg/ml	[26, , 52, , 53]
Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD)	5-15 mM	[26, , 52, , 54]

Wie bereits erläutert, existieren für Hüllviren zwei Hauptwege des viralen Eintritts: (1) Der endosomale/endozytotische Weg und (2) der nicht-endosomale Weg [55, , 56] . Es existieren auch Viren, die beide Wege nutzen können. Das Japanische Encephalitis Virus (JEV) kann sowohl mit der Plasmamembran fusionieren, als auch durch endozytotische Aufnahme in die Zelle gelangen [57] . In allen Fällen ist es für die Freisetzung des viralen Genoms wichtig, dass virale und zelluläre Membran fusionieren [58] .



Legende:

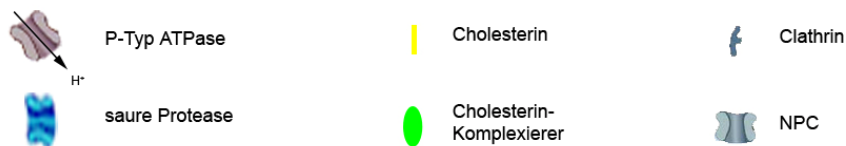


Abbildung 3: Die Wirkungsweise lysosomotroper Substanzen und anderer Inhibitoren (modifiziert, [1]) .Lysosomotrope Substanzen wie Ammoniumchlorid (A), Monensin (B), Bafilomycin A1 und Concanamycin A (B) führen zur Neutralisierung des sauren Lumens von Endosomen und verhindern so die Auslösung des pH-abhängigen Fusionsprozesses. (C) Chlorpromazin verhindert die Bildung Clathrin-haltiger Vesikel und somit den endozytotischen Transport der Zelle. (D) MβCD und Filipin III führen zur Cholesterolverarmung der Plasmamembran der Zielzelle. (E) Proteaseinhibitoren wie Leupeptin und E-64 inhibieren Cysteineproteasen im Lumen von Endosomen.

In Abbildung 3 sind die Wirkungsweisen der einzelnen Inhibitoren veranschaulicht, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Chlorpromazin (Abbildung 3 C) inhibiert die Endozytose, indem es die Bildung Clathrin-haltiger Vesikel hemmt [47] und so die gesamte Clathrin-abhängige Endozytose der Zelle zum Erliegen kommt [38, , 44, , 45, , 46] . Um die pH-Erniedrigung in den Endosomen zu verhindern, werden lysosomotrope Substanzen wie *Ammoniumchlorid* (Abbildung 3 A), eine schwache Base, die in endosomalen Vesikeln akkumuliert und dadurch zur Neutralisierung des pH-Werts im Endosom führt [5, , 30, , 39, , 59] , verwendet. Einen ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzt *Monensin* (Abbildung 3 A), ein Ionophor, welches den Protonengradienten über der endosomalen Membran zerstört und somit eine Erhöhung des pH-Wertes auslöst [28, , 40, , 48, , 49] . Die Substanzen *Bafilomycin A1* und *Concanamycin A* (Abbildung 3 B) verhindern die Ansäuerung des Lumens zellulärer Organellen, indem sie die V-Typ- H^+ -ATPase in eukaryotischen Zellen inhibieren [36, , 39, , 40, , 60] .

Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) oder Filipin III führen zur Cholesterolverarmung der Plasmamembran: (1) M β CD extrahiert Cholesterol aus der Plasmamembran und (2) Filipin III bindet es und verbleibt in der Membran (Abbildung 3 D). Für MHV und andere umhüllte Viren konnte bereits ein wesentlicher Einfluss von Cholesterol auf den Eintritt gezeigt werden [52, , 54, , 61] . In neuesten Untersuchungen wurde der Einfluss endosomaler Proteasen auf die Fusion von viraler und endosomaler Membran von SARS-CoV, MHV-2 (Coronaviren) und Ebolavirus (EboV), gezeigt [4, , 5, , 6] . In diesen Experimenten wurden unter anderem Proteaseinhibitoren wie Leupeptin und E-64 verwendet (Abbildung 3 E), die die Cysteinproteasen Cathepsin L und B im endosomalen Lumen hemmen.

A.2 Virale Fusionsproteine

Für die zielgerichtete Einschleusung des viralen Genoms ist es für umhüllte Viren wichtig mit der Membran der Wirtszelle zu fusionieren. In jedem Fall sind einzelne oder ein Komplex viraler Oberflächenproteine für diesen Fusionsprozess verantwortlich. Virale Proteine unterscheiden sich grundlegend in ihrem Aktivierungsmodus und ihrer Struktur. Durch einen Auslöser wird das in der metastabilen Konformation vorliegende virale Fusionsprotein in einen Zustand versetzt, der es erlaubt über das exponierte Fusionspeptid (FP) in die Zielmembran einzudringen. Mehrere nachfolgende Konformationsumwandlungen im viralen Fusionsprotein führen zur Annäherung beider Membranen. Zunächst erfolgt eine lokale Hemifusion und die anschließende Bildung und Vergrößerung der Fusionspore ermöglicht die vollständige Verschmelzung beider Membranen. Eine Zusammenfassung über die Vielfalt viraler Fusionsproteine gibt Tabelle 3 [62] . Für Viren wie HIV-1 oder das Sendaivirus, die den nicht-endosomalen Weg nutzen [63, , 64] wird die Konformationsumwandlung durch Interaktion mit dem entsprechenden zellulären Rezeptor bei

neutralem pH-Wert direkt an der Plasmamembran ausgelöst. Andere Viren, wie die Orthomyxoviren, zu denen das Influenzavirus A zählt, werden von den Zellen über den endosomalen Weg aufgenommen. In diesem Fall wird das endosomale Lumen durch die Aktivität einer ATP-hydrolysierenden Protonenpumpe (V-Typ ATPase) angesäuert [40] und dadurch eine Konformationsumwandlung im viralen Fusionsprotein ausgelöst, was zur Vermittlung der Fusion von viraler und endosomaler Membran führt. Kürzlich wurde für das aviane Sarkoma-Leukosis Virus (ASLV) ein weiterer Mechanismus für die Auslösung der Konformationsumwandlung entdeckt. Die Initiierung der Fusion benötigt zunächst die Interaktion des viralen Proteins mit dem zellulären Rezeptor und erst die anschließende pH-Erniedrigung im endosomalen Lumen führt zur Konformationsumwandlung des Fusionsproteins und somit zur Fusion von viraler und zellulärer Membran [7, , 62] .

Tabelle 3: Virale Fusionsproteine

(A) Virale Fusionsproteine [62]				
Virusfamilie	Proteine	pH Fusion	Klasse	Fusionspeptide
Orthomyxovirus	HA	sauer	I	N-terminal
Alphavirus	E1	sauer	II	intern
Flavivirus	E	sauer	II	intern
Rhabdovirus	G	sauer	?	intern
Bunyavirus	G1/G2	sauer	?	?
Arenavirus	GP	sauer	?	?
Filovirus	GP	sauer	I	intern
Retrovirus	Env	neutral	I	N-terminal, intern
Herpesvirus	gB, gD, gH, gL	neutral	?	?
Coronavirus	S	neutral	I	intern
Poxvirus	unbekannt	neutral	?	?
Hepadnavirus	S	neutral?	?	?
Iridovirus	unbekannt	unbekannt	?	?
(B) Klassifizierung viraler Fusionsproteine [65]				
Virusfamilie	Virusspezies	Klasse	Fusionsprotein	
Orthomyxoviridae	Influenza A	I	HA	
	Influenza C		HEF	
Paramyxoviridae	Semianvirus 5		F	
	Humaner Parainfluenzavirus			
	NDV			
	RSV			
Filoviridae	EboV	I	GP2	
	MMLV		TM	

Retroviridae	HIV-1		gp41
	SIV		gp41
	HTLV		gp21
	Human syncytib-2		TM
	Visnavirus		TM
Coronaviridae	MHV		S2
	SARS-CoV		E2
Flaviviridae	TBEV	II	E
	Dengue 2 und 3		E
Togaviridae	SFV		E1
Rhabdoviridae	VSV	III	G
Herpesviridae	HSV		gB

Alle bekannten viralen Fusionsproteine bestehen aus einer großen extrazellulären Ektodomäne (Ekto), einer Transmembrandomäne (TM) und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (CT). Virale Fusionsproteine werden basierend auf den strukturellen Eigenschaften der Postfusionskonformation in drei Klassen I-III gegliedert [65, , 66, , 67] . Fusionsproteine der Klasse I werden als Vorläufer synthetisiert, die durch Proteasen der Wirtszelle in zwei Untereinheiten gespalten werden. Teilweise bleiben diese wie im Fall des Hämagglutinins (HA) des Influenzavirus kovalent über Disulfidbrücken oder wie im Fall des Env-Proteins von HIV durch nicht-kovalente Interaktion miteinander assoziiert. Die proteolytische Spaltung des viralen Fusionsproteins ist ein kritischer Punkt, denn hier wird der metastabile Zustand des Proteins generiert [68] . Sowohl im metastabilen als auch im fusionsaktiven Zustand bilden Fusionsproteine der Klasse I Trimere aus. Die fusionsaktiven Untereinheiten bilden eine „Hairpin“-Konformation, die aus einem zentralen α -helikalen „Coiled-Coil“ besteht, welches aus den „Heptad-Repeat“ (HR)-Sequenzen HR1 und HR2 gebildet wird [69] . Die endgültige Form niedrigster potentieller Energie enthalten „Sechs-Helix-Bündel“ (6HB) [70] , die eine relativ lange (65-115 Å) zentrale „Coiled-Coil“ Struktur aufweisen. Das antiparallele „Sechs-Helix-Bündel“ findet man außerdem bei Fusionsproteinen anderer Hüllviren wie dem Retrovirus HIV-1, dem Filovirus Ebola und dem Paramyxovirus SV5 [63, , 71, , 72, , 73, , 74, , 75] . Es stellt somit eine hochkonservierte Struktur dar. Die fusionsaktive Struktur besteht bei Klasse II-Proteinen aus β -Faltblättern [69, , 76, , 77] . Die strukturelle Umlagerung von der Prä- in eine Postfusionskonformation resultiert immer in einer stabilen „Hairpin“-Konformation, die es der zellulären und viralen Membran ermöglicht durch Annäherung von Transmembrandomäne und Fusionspeptid zu verschmelzen. In neuesten Studien konnte eine dritte Klasse viraler Fusionsproteine identifiziert werden. Zu dieser gehören die viralen Glykoproteine G von VSV und gB des Herpes Simplex Virus (HSV) [78, , 79] . Diese Proteine zeichnen sich durch die Bildung einer trimeren „Hairpin“-Struktur aus, die zwei strukturelle

Elemente aufweist: Einen (i) α -helikalen trimeren Kern und (ii) zusätzlich zwei Fusionssschlaufen, die am Ende der β -Faltblätter lokalisiert sind (Tabelle 4). Detaillierte Eigenschaften der viralen Fusionsproteine der Klasse I und II wurden in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Eigenschaften viraler Fusionsproteine der Klassen I und II [62]

Eigenschaften	Klasse I	Klasse II
Typ integraler Membranproteine	Typ I	Typ I
synthetisiert als	inaktiver Vorläufer	inaktiver Vorläufer
Status auf Virion	metastabil	metastabil
Orientierung im Virus (bezüglich der Membran)	perpendikulär	parallel
Zum metastabilen Zustand umgewandelt durch	proteolytische Prozessierung im Fusionsprotein-Vorläufer	proteolytische Prozessierung eines assoziierten Proteins
Zahl der Untereinheiten im Fusionsprotein	2	1
Sekundärstruktur der Fusionsuntereinheit	α -Helix	β -Faltblatt
Aktivierung der fusionsaktiven Form durch	niedriger pH oder Rezeptor(en)	niedriger pH
oligomerer Status des metastabilen Proteins	Trimer	Dimer
oligomerer Status des fusionsaktiven Proteins	Trimer	Trimer
Lokalisierung des Fusionspeptids	N-terminal oder intern	interner Loop
Struktur der finalen fusionsaktiven Form	Trimere „Hairpin“-Struktur („Coiled-Coil“)	Trimere „Hairpin“-Struktur (nicht-„Coiled-Coil“)

Die Struktur von Fusionsproteinen der Klasse II unterscheidet sich deutlich von denen der Klasse I. Ein sehr gut untersuchtes Beispiel ist das Glykoprotein (E) des Tick-Borne-Encephalitis Virus (TBEV). Während der Synthese bilden das E-Protein und das Membranglykoprotein prM Heterodimere. Während der Virusreifung spaltet eine Wirtszellprotease prM, was in der Reorganisation des Proteins auf der Oberfläche des Virus resultiert [80]. Nach Spaltung von prM liegt E als metastabiles Homodimer vor. Die Ektodomänen des Proteins orientieren sich antiparallel. Im Unterschied zu den Trimeren der Klasse I Proteine, liegt die Ektodomäne des E-Proteins parallel zur viralen Membran vor. Das E-Protein von TBEV besteht zum Großteil aus β -Faltblättern [66, , 81]. Ähnliches gilt für die Struktur des Klasse II Spikeproteins des Semlikiorestvirus (SFV). Im Fall des S-Proteins von SFV besteht das metastabile Oligomer aus einem Heterodimer aus zwei membranverankerten Proteinen E1 und E2 mit einem assoziierten dritten Protein E3 [82].

A.2.1 Aktivierung der Fusion durch niedrigen pH-Wert

Für die Aktivierung der Fusionsreaktion durch einen niedrigen pH-Wert ist das Influenzavirus A ein besonders gut untersuchtes Beispiel. Es besitzt zwei Glykoproteine: die Neuraminidase (NA) und das Hämagglutinin (HA). Die Neuraminidase spaltet Sialinsäuremoleküle auf der Oberfläche der Zellen oder Viruspartikel. Diese Spaltungsreaktion ermöglicht die Abtrennung neu gebildeter Viruspartikel von der Wirtszelle. Die Neuraminidase entfernt auch die Sialinsäure vom HA-Protein selbst und verhindert so die Aggregation der Viren [83]. Hämagglutinin vermittelt sowohl die Bindung der Viren an sialinsäurehaltige, zelluläre Rezeptoren, als auch die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran [84, , 85]. Es wird als fusionsinaktives Vorläuferprotein HA0 synthetisiert, das als Trimer vorliegt (Abbildung 4 A und F). Die fusionskompetente Form des HA-Trimers entsteht nach der Spaltung des HA0 durch zelleigene Proteasen im *trans*-Golgi-Netzwerk. HA1 bildet die globuläre Kopfdomäne, die die Rezeptorbindungsdomäne (RBD) beinhaltet und einen Teil des Stammes der HA-Ektodomäne bildet (Abbildung 4). Den Rest des Stammes bildet HA2 (Abbildung 4). Außerdem beinhaltet HA2 die Transmembrandomäne aus 24-28 ungeladenen, hydrophoben Aminosäuren und die C-terminale intravirale Domäne. Am N-Terminus des HA2 befindet sich das Fusionspeptid (Abbildung 4), das innerhalb der Virusfamilie hoch konserviert ist. Es besteht aus 16 hydrophoben Aminosäuren und spielt eine essentielle Rolle bei der Fusionsvermittlung [86]. Die gesamte Ektodomäne ragt etwa 135 Å aus der Membran hervor und kann durch Bromelain, eine Cysteinprotease, gespalten werden. Die so isolierte HA-Ektodomäne (BHA, bromelainingespaltenes HA) wurde bereits kristallisiert und die Röntgenkristallstruktur mit einer Auflösung von 3 Å bei neutralem pH-Wert bestimmt [87]. Diese Struktur des HA ist allerdings nicht fusionsaktiv. Bei niedrigen pH-Werten findet eine irreversible Konformationsumwandlung des HA statt. Im Zuge dieser Strukturänderungen ist es in der Lage die Membranfusion zu induzieren.

Die pH-neutrale, fusionsinaktive Konformation des HA entspricht dem metastabilen Zustand (Abbildung 4 A). Der Hauptteil der benötigten Energie wird schon bei der Faltung des Proteins generiert [88]. Wie bereits erwähnt werden Influenzaviren nach der Bindung an die Wirtszelle über Endozytose aufgenommen. Während der Reifung der Endosomen kommt es durch die Aktivität von Protonenpumpen zur pH-Erniedrigung. Im späten Endosom liegt der pH-Wert bei etwa 5.5, was für die Induktion der Konformationsumwandlung des HA-Proteins ausreicht. Die Protonierung schwächt die Wechselwirkung zwischen den HA1-Untereinheiten des Trimers [89]. Dadurch kommt es zur Reorganisation der HA1-Domänen, die für weitere Strukturänderungen wichtig ist [89, , 90, , 91, , 92, , 93]. Durch den so genannten „spring-loaded“-Mechanismus trennen sich die globulären Kopfdomänen und geben HA2 frei, das durch HA1 klammerartig in einem metastabilen Zustand gehalten wird (Abbildung 4 A). Das Fusionspeptid am Ende der verlängerten dreisträngigen „Coiled-Coil“-Region wird exponiert (Abbildung 4 B). Es kann mit der Ziellmembran

interagieren und in diese insertieren. Durch Umlagerung von der Helix- zur Loop-Konformation bildet sich eine verkürzte Helix aus (Abbildung 4 C), die es der verlängerten C-terminalen Domäne ermöglicht zu „flippen“ und sich antiparallel zur zentralen „Coiled-Coil“-Einheit auszurichten. Durch Verkürzung der gesamten Struktur kommen Fusionspeptid und Transmembrandomäne in unmittelbare Nähe und eine Annäherung beider Membranen kann erfolgen (Abbildung 4 D).

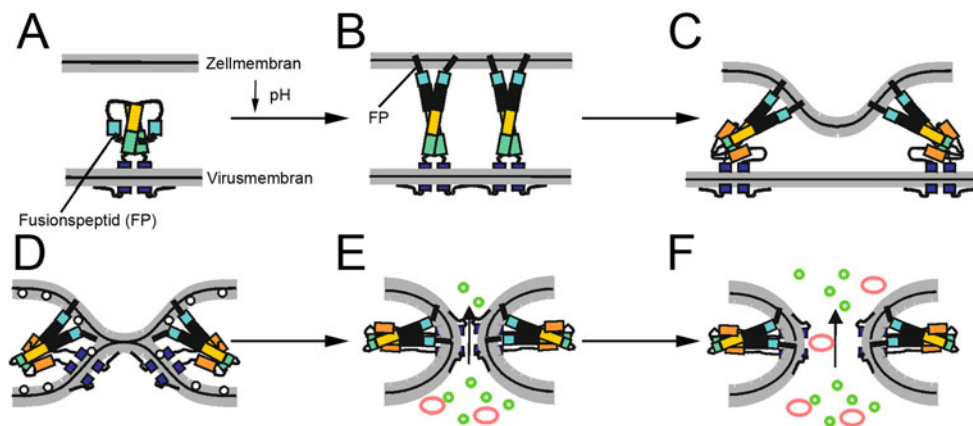


Abbildung 4: Modell der HA-vermittelten Membranfusion (A. Herrmann). (A) HA liegt zunächst im metastabilen Zustand vor. (B) Nach Bindung und pH-Erniedrigung kommt es zu Konformationsumwandlungen innerhalb des Proteins. Die Fusionspeptide tauchen in die Zielmembran ein. (C) Durch einen als „Spring-Loaded“ Mechanismus bezeichneten Vorgang kommt es zur Verkürzung der HA-Moleküle, durch die eine Annäherung der N-terminalen Fusionspeptide und der C-terminalen Transmembrandomänen erfolgt, was schließlich zur Annäherung der Membranen und zur Ausbildung der „Sechs-Helix-Bündel“-Struktur führt. (D) Zunächst wird die Hemifusion ausgelöst. Die äußeren Lipidschichten verschmelzen miteinander. (E) Nachdem die Membranen fusioniert sind, kommt es zur Ausbildung der Fusionspore. (F) Die Weitung der Fusionspore ermöglicht die Entlassung des viralen Nukleokapsids.

Das nächste Fusionsintermediat ist die Hemifusion, ein metastabiler Zustand, der sehr kurzlebig ist (Abbildung 4 D). Die äußeren Lipidschichten der beiden Membranen verschmelzen miteinander und bilden den „Stalk“, eine halsähnliche Struktur mit einer negativen Krümmung. Die noch nicht fusionierten inneren Lipidschichten bilden ein „Diaphragma“ aus (Abbildung 4 D). Nachdem auch die inneren Lipidschichten miteinander verschmolzen sind, folgt die Bildung einer frühen Fusionspore mit einer Porengröße von 1-2 nm (Abbildung 4 E) [94]. Die frühen Poren können sich wiederholt öffnen und schließen („flickering“). Am Ende findet eine irreversible Weitung der Fusionsporen statt, durch die das virale Nukleokapsid schließlich in das Cytoplasma entlassen wird (Abbildung 4 F).

A.2.2 Aktivierung der Fusion durch Rezeptorinteraktion

Die Aktivierung der pH-neutralen Fusionsproteine erfolgt über die Interaktion mit einem Rezeptor/Rezeptorkomplex auf der Oberfläche der Zielzellen [13]. Viren, die unter neutralen

Bedingungen fusionieren können, verschmelzen direkt mit der Plasmamembran der Zielzelle oder mit pH-neutralen intrazellulären Kompartimenten, wie dem Caveosom [56]. Auch für Viren, die eigentlich bei neutralem pH-Wert fusionieren ist es teilweise möglich, dass eine Fusionsaktivierung durch niedrigen pH-Wert ausgelöst werden kann [95]. Die Fusion bei neutralem pH weist im Vergleich zur Aktivierung bei niedrigem pH eine deutliche Temperaturgrenze auf. Bei Temperaturen unter 20°C ($T < 20^\circ\text{C}$) findet fast keine Fusion mehr statt. Das Env-Protein des HIV gehört zur Klasse I der Fusionsproteine. Es wird wie das HA des Influenzavirus als Vorläuferprotein synthetisiert und während der Maturierung in gp120 und gp41 gespalten. Die native/metastabile Konformation des Env-Proteins besteht aus Trimeren, die ihrerseits aus Heterodimeren von gp120, der rezeptorbindenden Domäne, und gp41, der Fusionsdomäne, gebildet werden. Die Bindung des CD4-Rezeptors führt zu einer Konformationsumwandlung, die es ermöglicht den Co-Rezeptor zu binden. Nach dessen Bindung es zu weiteren Konformationsumwandlungen im Env-Protein kommt [96]. Der erste Schritt nach Bindung des Rezeptor-Co-Rezeptor-Komplexes durch gp120 ist die Dissoziation dieser Domäne. Dadurch werden die Fusionspeptide exponiert und können in die Ziellmembran eintauchen. Ein Cluster mehrerer Env-Proteine in dieser Konformation bildet die Fusionsstelle aus. Nach weiteren Konformationsumwandlungen innerhalb des Proteins kommt es zur Ausbildung der „Sechs-Helix-Bündel“-Struktur und zur Annäherung beider Membranen, die in der Hemifusion und der Ausbildung der Fusionspore mündet. Nach Ausbildung der Fusionspore und Porenweiterung kommt es zur Entlassung des viralen Nukleokapsids. Der Fusionsmechanismus des Env-Proteins ist dem des HA-Proteins sehr ähnlich. Lediglich der Auslöser der Konformationsumwandlung im viralen Protein ist unterschiedlich. Folgende allgemeingültige Eigenschaften des Fusionsmechanismus gelten für Fusionsproteine der Klasse I: (1) Umwandlung des metastabilen in einen aktivierten Zustand. (2) Exposition und Umlagerung des Fusionspeptids zur Bindung der Ziellmembran. (3) Rekrutierung mehrerer aktivierter Fusionsproteine zu einer Fusionsstelle [97, , 98, , 99, , 100]. (4) Die anschließenden Konformationsumwandlungen und die Ausbildung der „Sechs-Helix-Bündel“-Struktur ermöglichen die Annäherung der Fusionspeptide und Transmembrandomäne.

A.2.3 Die Zwei-Schritt Aktivierung des Alpharetrovirus

Nach neuesten Erkenntnissen gibt es ein drittes Modell der viralen Fusion. Dies konnte kürzlich für das Alpharetrovirus (ASLV) gezeigt werden. Im ersten Schritt findet bei neutralem pH die Bindung des Virus über das virale Glykoprotein *Env* an den zellulären Rezeptor statt. Die anschließende Exposition im sauren Milieu des Endosoms führt zur Auslösung der Konformationsumwandlung im viralen Fusionsprotein, die schließlich in der Fusion beider Membranen mündet [7]. Die Rolle des niedrigen pH-Werts konnte durch zwei Schlüsselbeobachtungen enträtselt werden: (1) Die ständige Anwesenheit lysosomotroper Substanzen unterdrückte die Synthese des viralen reversen

Transkripts und (2) Zellen, die das Env-Protein und den viralen Rezeptor exprimierten, bildeten erst nach Inkubation bei niedrigem pH-Wert Synzytien aus. Eine kürzlich erschienene Studie konnte zeigen, dass die Fusion des Alpharetrovirus bei neutralem pH bis zur Stufe der Lipidmischung (Hemifusion) erfolgt [95] , und dass die anschließende Rezeptorbindung und Exposition im endosomalen Milieu mit niedrigem pH-Wert spezifische Konformationsumwandlungen im viralen Env-Protein auslösen [101] .

A.3 Virale Fusionspeptide

Virale Fusionsproteine der Klasse I enthalten generell ein Fusionspeptid. Es kann intern oder N-terminal lokalisiert sein (Tabelle 5) [102, , 103, , 104] . Beispiele für interne Fusionspeptide sind das gp37-Protein des ASLV und das GP2-Protein des Ebolavirus. Das Fusionspeptid kann sich ferner am oder nahe dem N-Terminus befinden. Dies ist z.B. bei gp41 von HIV und bei HA des Influenzavirus A der Fall [84, , 105, , 106, , 107] . Bestimmte Eigenschaften sind in allen viralen Fusionsproteinen hoch konserviert. Die wichtigsten Eigenschaften eines Fusionspeptids können wie folgt zusammengefasst werden [108] : (1) Fusionspeptide sind kurze hydrophobe Sequenzen eines Proteins und bestehen aus 16–26 Aminosäuren [109, , 110, , 111] . (2) Sie sind reich an hydrophoben Resten wie Alanin (A), Glycin (G) und Phenylalanin (F) [109, , 112, , 113] . (3) Ein kanonisches Tripeptid (YFG oder FXG) ist in Retroviren, Paramyxoviren und Filoviren hoch konserviert [112, , 114, , 115, , 116] . (4) Bei internen Fusionspeptiden ist die Anwesenheit eines Prolins (P) nahe oder im Zentrum der Sequenz kritisch für die Interaktion mit der Zielmembran [116, , 117, , 118, , 119] . (5) Die Tendenz zur Bildung von β -Faltblattstrukturen oder α -Helices. (6) Der Wert für das Hydrophobe Moment (ΔG) sollte zwischen 3 und 4 kcal/mol liegen. (7) Die Möglichkeit der HR-Sequenzen die „Coiled-Coil“-Konformation einzunehmen.

Tabelle 5: Virale Fusionspeptide

Lage	Fusionsprotein	Virus	Sequenz
N-terminal	Klasse I	Influenza HA2	GLFGAIAGFIENGWEG
		Sendai F1	FFGAVIGTIALGVATA
		RSV F1	FLGFLLGVGSAIASGV
		HIV gp41	AAIGALFLFGLGAAGSTMGAA
Intern	Klasse I	EboV GP	GAAIGLAWIPYFGPAA
		ASLV gp37	IFASILAPGVAAAQAL
	Klasse II	SFV E1	DYQCKVYTGVIYPFMWGGAYCFCD
		TBE E	DRGWGNHCGLFGKGSIVA
Intern	Klasse III	VSV G	QGTWLNLFPPQSCGYATV

Fusionspeptide sind hydrophobe Proteinsequenzen, die mit der Membran in Wechselwirkung treten und eine essentielle Rolle bei der Fusionsreaktion übernehmen [120, , 121, , 122, , 123] . Während des Fusionsprozesses müssen Fusionspeptid und Transmembrandomäne stabil mit der jeweiligen Membran assoziiert bleiben, um eine erfolgreiche Fusion zu gewährleisten. Die Konformationsumwandlung im viralen Fusionsprotein ermöglicht es dem Fusionspeptid stabil in der Ziellmembran zu verankern und weitere Konformationsumwandlungen der Ektodomäne des viralen Fusionsproteins führen zur Fusion. Innerhalb einer Virusfamilie ist die Sequenz meist hoch konserviert. Gallaher und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass obwohl sich die Fusionspeptide der Fusionsproteine der Klasse I von Orthomyxo-, Paramyxoviren, Retro-, Arena- und Filoviren in Länge und Sequenz stark unterschieden, strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind [102, , 105] . Fusionspeptide der viralen Fusionsproteine der Klasse II zu denen Alpha- und Flaviviren gehören, sind meist intern lokalisiert und bilden drei antiparallele β -Faltblatt Strukturen aus [66, , 124, , 125] .

A.3.1 N-terminale Fusionspeptide

Anhand von Untersuchungen an synthetischen Fusionspeptiden konnten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie sich Fusionspeptide in An- oder Abwesenheit von Membranen verhalten [120, , 121, , 126, , 127] . In Lösung liegen die Peptide ungeordnet vor, assoziieren sie jedoch mit Membranen, nehmen sie eine Sekundärkonformation in Form von α -helikalen oder β -Faltblattstrukturen ein. Die untersuchten N-terminalen Fusionspeptide nehmen nach Assoziation mit der Membran zudem einen bestimmten Winkel ein und tauchen ausschließlich in eine Membranhälfte ein. Mutationsstudien an Fusionspeptiden ergaben, dass die Fähigkeit der Einstellung eines bestimmten Winkels essentiell ist, um die Membranstruktur zu destabilisieren [121] . Bei niedrigem pH-Wert besteht das Fusionspeptid von HA aus einer N-terminalen Helix, einem Knick und einer kurzen C-terminalen Helix [128] . Beide Helices tauchen in das äußere Leaflet der Lipiddoppelschicht ein, der Knick dagegen verbleibt an der Oberfläche. Die Glycine im Inneren der Struktur interagieren mit der Lipidschicht, wogegen geladene Aminosäurereste an der Oberfläche verbleiben und mit der hydrophilen Umgebung wechselwirken können. Werden die Glycinreste mutiert, kommt es zu veränderten Eigenschaften des Proteins. Ersetzt man Glycin (G1) durch Valin (G \rightarrow V) ist die Fusionsfähigkeit völlig gehemmt. Wird Glycin (G1) gegen Serin (G \rightarrow S) ausgetauscht, wird lediglich Hemifusion vermittelt oder es bilden sich kleine nicht expandierende Fusionsporen [123, , 129, , 130] . Simulationen des Fusionspeptids von HIV-1 und seiner Mutanten weisen ähnliche membranpenetrierende Orientierungen auf wie HA [131] .

A.3.2 Interne Fusionspeptide

Die meisten internen Fusionspeptide weisen neben einer großen Zahl apolarer Reste ein konserviertes Prolin im oder nahe des Zentrums auf (Tabelle 5). Dieser ist meist hoch konserviert. Mutationsstudien am Prolinrest des Fusionspeptids des EnvA-Proteins von ASLV zeigen eine Stabilisierung der „ β -Turn“ Struktur [117]. Für das Fusionspeptid von ASLV wird eine „ β -Loop“-Struktur angenommen, die durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Ähnliches konnte für das interne Fusionspeptid des Ebolavirus gezeigt werden. Nach Mutation des konservierten zentralen Prolinrests und der flankierenden Cysteinreste konnte die Fusionseigenschaft vollständig inhibiert werden [119, , 132]. Für das interne Fusionspeptid des G-Proteins von VSV konnte nach Mutation des zentralen Prolinrests ebenfalls eine deutlich herabgesetzte Fusionsfähigkeit nachgewiesen werden [133]. Die Idee einer Loop-Struktur für fusionskompetente Peptide wurde auch für das Fusionspeptid von TBEV E und SFV E1 gezeigt [67, , 81, , 134]. In einigen Fällen kann auch die Kooperation mehrerer Loop-Strukturen zur Auslösung der Fusion führen. Interne Fusionspeptide enthalten wie N-terminale Peptide eine große Zahl an Glycin- und hydrophoben Resten (Tabelle 5). Tauscht man einen der Glycinreste des E1-Fusionspeptids von SFV gegen Alanin aus (G \rightarrow A), kommt es zur Verschiebung des pH-Schwellenwertes zur Auslösung der Fusion. Die Mutation zur Asparaginsäure (G \rightarrow D) hebt die Fusionseigenschaft vollständig auf [135]. Veränderungen der hydrophoben Aminosäurereste am Anfang, der Mitte oder am Ende des internen Fusionspeptids von ASLV EnvA zu geladenen Resten beeinträchtigt die Vermittlung der Fusion gravierend [103]. Ähnlich wichtig sind die Tryptophan- und Glycinreste im internen Fusionspeptid des GP-Proteins von EboV [119]. Am Ende der Loop-Struktur des E-Fusionspeptids von TBEV ist ein großer hydrophober Rest essentiell für die Vermittlung der Membranfusion [81]. Zusammenfassend ist zu bemerken, dass interne Fusionspeptide zur Vermittlung der Membranfusion eine oder mehrere Loop-Strukturen aufweisen und ein Gemisch aus hydrophoben und flexiblen Aminosäureresten benötigen.

A.3.3 Die Rolle viraler Fusionspeptide während der Fusion

Fusionspeptide spielen an verschiedenen Stellen des Fusionsprozesses eine essentielle Rolle. Durch Mutationen der Fusionspeptide, bei der ungeladene Reste in geladene Reste umgewandelt wurden [103, , 136, , 137, , 138], konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Fusionsproteins in der Zielmembran spielen. Die Energie, die durch das Eintauchen des Fusionspeptids eines einzelnen HA-Trimers in die Zielmembran entsteht, ist ausreichend, um die Ausbildung der „Stalk-Struktur“ auszulösen [139]. Das Fusionspeptid kann zudem helfen die „Stalk-Bildung“ auszulösen indem es Wasser von der Lipid-Wasser Grenze entfernt und somit zur Erniedrigung der abstoßenden Kräfte zweier fusionierender Membranen

beiträgt [126] . Fusionspeptide sind außerdem bei der Öffnung und Weitung der Fusionspore beteiligt sind. Die beschriebene HA-Mutante, die anstelle des Glycins (G1) ein Serin (S) trägt, kann nur die Mischung von Lipiden („Lipid-Mixing“), also Hemifusion vermitteln, aber keine vollständige Fusion auslösen [129] . Defekte in der Ausbildung von Synzytien und eine Einschränkung der Infektivität zeigt die Mutante des HIV Env-Proteins, bei der das Fusionspeptid die Mutation V2E (V→E) beinhaltet [136] . Biophysikalische Studien an synthetischen Fusionspeptiden, die diese Mutation tragen, weisen daraufhin, dass eine Aggregation mehrerer Fusionspeptide notwendig ist, um die Porenbildung auszulösen [140, , 141] .

A.4 Coronaviren

Coronaviren gehören zur Ordnung der Nidovirales, Familie der Coronaviridae und zum Genus Coronavirus. Sie lösen ein weites Spektrum an Krankheiten in Mensch und Tier aus. Darunter betreffen die häufigsten Erkrankungen die respiratorischen und inneren Organe. Die Epithelzellen des Verdauungs- und respiratorischen Trakts stellen die wichtigsten Orte der Virusreplikation dar. Aufgrund ihrer phylogenetischen Eigenschaften lassen sie sich in zwei Untergruppen gliedern. In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits das Maushepatitisvirus A59 (MHV-A59) und andererseits der humanpathogene Erreger des schweren akuten Atemwegssyndroms - Severe Acute Respiratory Syndrome - kurz SARS-CoV analysiert, um den Mechanismus der Verschmelzung von Virus- und Wirtszellmembran zu untersuchen. MHV-A59 löst sowohl enterische und respiratorische Infektionen, als auch Diarrhö, Hepatitis und akute sowie chronische Demyelinisierungserkrankungen des Zentralnervensystems in Mäusen aus (Siddell et al., 1983; Wege et al., 1982). Es wurde erstmalig im Jahr 1951 von Gledhill und Andrewes beschrieben [142] und 1961 von Manaker isoliert [143] . Es gehört zur Gruppe II. SARS-CoV wurde im Jahr 2003 erstmalig entdeckt und isoliert. Im Zusammenhang mit diesem insbesondere in Südostasien beheimateten Virus traten zwei große Infektionswellen in den Jahren 2002/2003 und 2004 auf, infolge derer fast 1000 Menschen erkrankten und starben. Eine genaue Definition der phylogenetischen Zugehörigkeit für SARS-CoV steht noch aus. Angenommen wird eine enge Verwandtschaft zur Gruppe II. Bis zur endgültigen Zuordnung wird dieses Virus in der eigenständigen Gruppe III geführt.

A.4.1 Aufbau und Replikation von Coronaviren

Coronaviren weisen mit 30 kb das größte RNA-Genom aller bekannten RNA-Viren auf. Das virale Genom besteht aus einzelsträngiger RNA in positiver Orientierung (ssRNA (+)) und besitzt wie zelluläre mRNAs eine 5'-Cap-Struktur sowie einen 3'-Poly-A Strang.

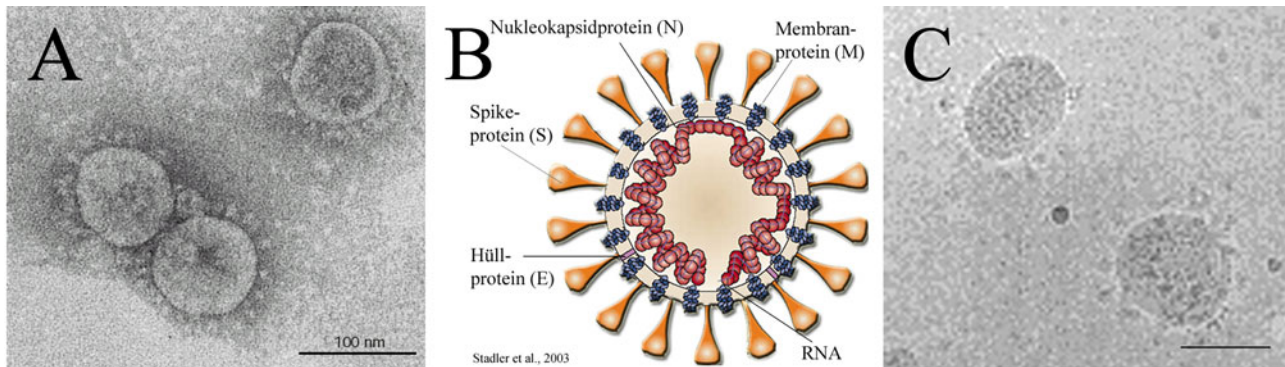


Abbildung 5: Coronaviren. (A) EM-Micrograph und (B) schematische Darstellung des SARS-CoV [144] . (C) EM-Micrograph von MHV-A59 (K. Ludwig und C. Böttcher, FU- Berlin). Balken: (A) 100 nm, (C) 200 Å.

Die RNA bildet zusammen mit den basischen viralen Nukleokapsidproteinen ribonukleäre Partikel (RNPs) aus, die mit dem „Envelope“-Hüllprotein (E), dem Matrixprotein (M) und darüber mit der viralen Hüllmembran assoziiert vorliegen (Abbildung 5). Die Strukturproteine der Coronaviren sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Virushülle besteht aus Lipiden der Wirtszellmembran und unterschiedlichen viralen Proteinen. Coronaviren besitzen zwei Arten membranverankerter Glykoproteine: (a) das Spikeprotein (S) und (b) die Hämagglutininesterase (HE) (Tabelle 6 und Abbildung 5 B). Die Hämagglutininesterase wird nicht in allen Coronaviren exprimiert. Das S-Protein bildet peplomere Strukturen, die weit aus der Hüllmembran des Virus herausragen und im Elektronenmikroskop deutlich sichtbar sind (Abbildung 5 A und C).

Tabelle 6: Strukturproteine der Coronaviren

Protein	Molekulargewicht (kDa)	Eigenschaft	Funktion
S	180-200	glykosyliertes Membranprotein Typ I; Trimer	Bindung an spezifischen Rezeptor, Fusionsaktivität
N	50-60	Hauptkomponente des Nukleokapsids; basisch	Kerntransportsignal
M	25	Membranglykoprotein	Verbindung zwischen Nukleokapsid und Virushülle
E	10	integrales Membranprotein	pH-regulierender Ionenkanal
HE*	60-70	Integrales Membranprotein	Unterstützung bei Bindung und Fusion

*HE – Hämagglutininesterase wird nur exklusiv in einigen Coronaviren der Gruppe II, nicht aber in MHV-A59 oder SARS-CoV exprimiert.

Virale Glykoproteine auf der Oberfläche der Virionen sind die Hauptantigene und lösen die nachfolgende Immunreaktion im infizierten Organismus aus. Dies wird sowohl für Diagnostik und

Therapie als auch für die Prophylaxe genutzt. Den weiteren großen Anteil viraler Proteine machen die Nichtstrukturproteine (NSP) aus, deren Funktion häufig noch ungeklärt ist.

Die Infektion der Wirtszelle erfolgt bei Coronaviren in mehreren Schritten (Abbildung 6). Im ersten Schritt binden die Viren an die Zielzelle. Dies geschieht über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Zelle (Abbildung 6 (1)). Die S1-Untereinheit des S-Proteins ist verantwortlich für die Interaktion mit dem Rezeptor, wogegen die S2-Untereinheit fusionsaktive Eigenschaften besitzt. Anschließend erfolgt der Eintritt in die Zelle. Es ist noch ungeklärt wie Coronaviren in die Wirtszelle aufgenommen werden. Nach Freisetzung des viralen RNA-Genoms in die Wirtszelle (Abbildung 6 (2)) findet die Replikation und Transkription statt (Abbildung 6 (3)). Mit Hilfe der Translationsmaschienerie der Wirtszelle werden die überhängenden offenen Leseraster (ORF1a und ORF1b) durch den so genannten „ribosomalen Frame-Shift“-Mechanismus in ein einziges Polyprotein translatiert. Viruskodierte Proteasen spalten das Polyprotein in einzelne Fragmente, so dass sich der virale Replikationsapparat ausbilden kann. Dieser synthetisiert anschließend die genomische virale Vollängen-RNA in Negativstrangorientierung (ssRNA (-)). Parallel wird durch die diskontinuierliche Transkriptionsstrategie ein geschützter Pool subgenomischer RNAs in Negativstrangorientierung generiert. Diese RNAs dienen später als Matrize für die Synthese der mRNAs in Positivstrangrichtung (Abbildung 6 (3)). Die Nukleokapsidproteine und die genomische RNA (ssRNA (+)) assemblieren im Cytoplasma zum helikalen Nukleokapsid (Abbildung 6 (4)). Die M-, E- und S-Proteine werden durch das ER zum Golgi-Apparat transportiert, in dem das „Budding“ stattfindet. Das N-Protein interagiert mit dem M-Protein, um die Assemblierung der Viruspartikel zu initiieren.

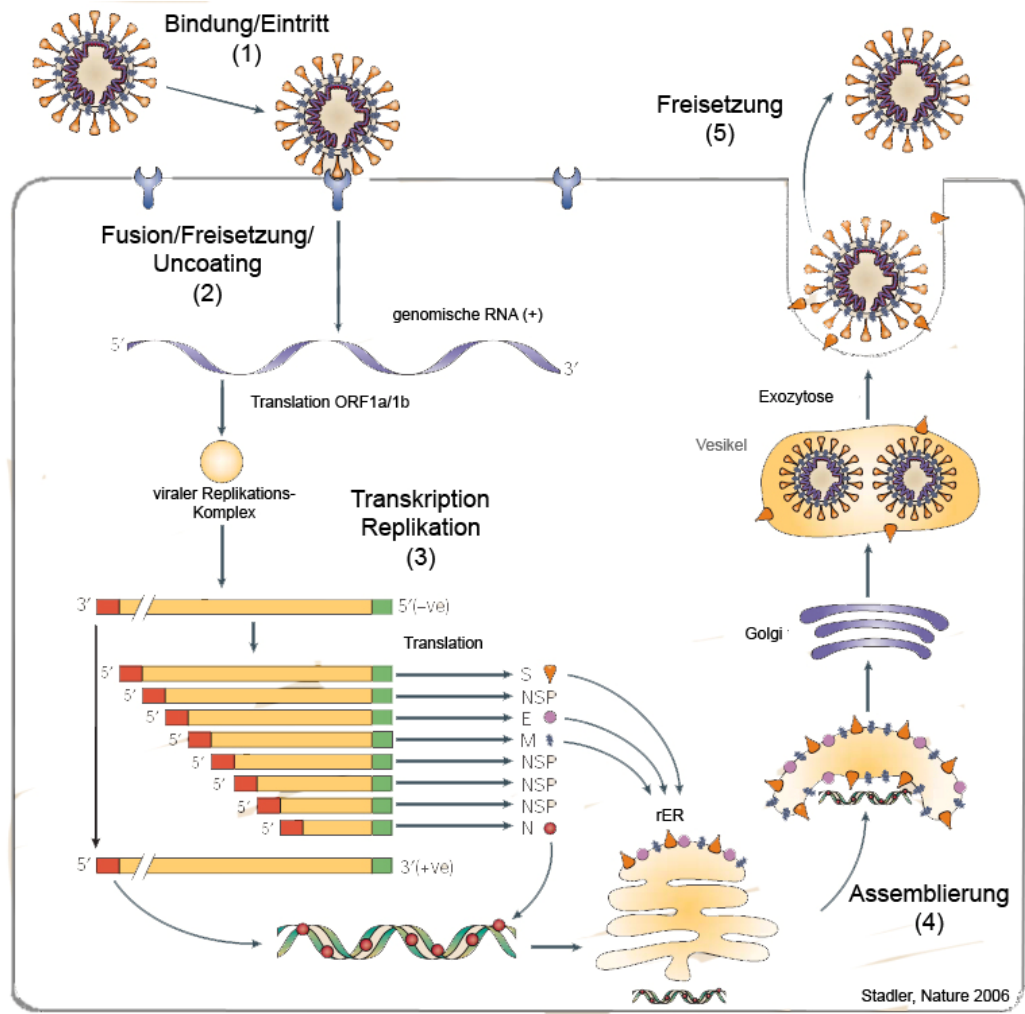


Abbildung 6: Replikationszyklus von Coronaviren [144]). (1) Bindung und Eintritt des Virus in die Zelle. (2) Fusion des Virus mit der zellulären Membran und Freisetzung des Nukleokapsids in die Wirtszelle (Uncoating). (3) Replikation und Transkription der viralen Proteine. (4) Assemblierung neuer Viruspartikel und (5) Freisetzung dieser. Zur Vereinfachung wurde nur eine Variante des Eintritts gezeigt.

Während des Transports des Virus durch den Golgi-Apparat werden die Kohlenhydratreste modifiziert. Bei einigen Coronaviren werden die S-Proteine hier proteolytisch in S1- und S2-Untereinheit gespalten. Die S-Proteine, die nicht in Viruspartikeln assemblieren, werden zur Zelloberfläche transportiert. Schließlich werden die Viren nach Fusion der virusbeladenen Vesikel mit der Plasmamembran von der Zielzelle freigesetzt (Abbildung 6 Freisetzung (5)) [144] .

A.4.2 Der virale Eintritt von MHV-A59

MHV-A59 bindet über das S-Protein an den zellulären CEACAM1a-Rezeptor. Der Eintritt des Virus ist mit Rafts assoziiert und erfolgt Cholesterol-abhängig. Obwohl die Cholesterolverarmung der Zellen keinen Einfluss auf die Virusbindung hat, weist sie einen starken inhibitorischen Effekt auf die Infektivität durch MHV auf [52, , 54] . Bis heute ist noch nicht bekannt, welcher der beiden

Wege des viralen Eintritts vom Coronavirus MHV-A59 genutzt wird. Es gibt Hinweise auf beide Wege [28, , 30, , 145] . Holmes et al. [146] konnten beobachten, dass die Fusion von MHV mit der Zielzelle allein durch Rezeptorbindung ausgelöst werden kann, was eine Initiierung der Konformationsumwandlung im S-Protein durch Rezeptorinteraktion bei neutralem pH-Wert nahe legt. Neueste Studien sprechen dem N-terminalen Bereich des CECAM1a-Rezeptors eine Hauptfunktion bei der Initiierung der Konformationsumwandlung im S-Protein zu [147, , 148, , 149, , 150] . Frühere Untersuchungen zeigen zudem, dass die S-Protein-vermittelte Zell-Zell-Fusion bei neutralem pH stattfinden kann. Dies geschieht nach Infektion mit MHV-A59 und führt zur Synzytienbildung. S-Proteine, die nicht in Viruspartikel sortiert werden, werden zur Zelloberfläche transportiert und können dort die Fusion zwischen den Zellen vermitteln. Einige Gruppen finden keinen oder nur einen geringen Einfluss lysosomotroper Substanzen auf die Infektivität von Mausfibroblastenzellen durch MHV-A59 [5, , 32, , 48, , 151] . Andere Untersuchungen belegen dagegen, dass die Infektion von MHV durch Behandlung der Wirtszelle mit lysosomotropen Substanzen beeinträchtigt werden kann [30, , 152, , 153] . Kryzstyniak et al. berichten für das Infektionsverhalten von MHV-3 eine Sensitivität gegenüber lysosomotropen Substanzen [153] . MHV-JHM kann in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl den endosomalen, als auch den nicht-endosomalen Weg nutzen [28, , 150] .

A.4.3 Das S-Protein von Coronaviren

Für die Bindung und die anschließende Vermittlung der Fusion von viraler und zellulärer Membran ist bei Coronaviren das S-Protein verantwortlich. Es gehört zur Klasse I viraler Fusionsproteine [154] , ist als Homotrimer organisiert und über die Transmembrandomäne in der viralen Hüllmembran verankert (Abbildung 7). Es besitzt ein Molekulargewicht von 180-220 kDa je Monomer.

A.4.3.1 Das S-Protein von SARS-CoV

Das trimere S-Protein von SARS-CoV weist ein Molekulargewicht von ungefähr 500 kDa auf [155] . Die S1-Untereinheit ist für die Bindung des zellulären Rezeptors - ACE2 [156] - und die S2-Untereinheit für die Vermittlung der Fusionsreaktion verantwortlich (Abbildung 7 E). Die Untereinheiten S1 und S2 bleiben über kovalente Disulfidbrücken miteinander assoziiert. Obwohl frühere Studien andeuten, dass die Spaltung des S-Proteins für die Vermittlung der Fusion nicht notwendig ist [152, , 157, , 158] , gibt es neuesten Untersuchungen zufolge Hinweise darauf, dass die Spaltung der Ektodomäne des S-Proteins von SARS-CoV und MHV-2 für die Fusionsreaktion essentiell sein könnte. Die proteolytische Spaltung des Proteins findet ausschließlich im

endosomalen Kompartiment der Zelle statt (Chandran et al., 2005; Qiu et al., 2006; Simmons et al., 2005).

Die S2-Untereinheit beinhaltet die Transmembrandomäne, das Fusionspeptid und die HR-Sequenzen HR1 und HR2 (Abbildung 7 B und E). HR1 und HR2-Domänen bilden den Fusionskern des S-Proteins und organisieren sich als „Coiled-Coil“ (Abbildung 7 D). Sie sind denen anderer Coronaviren [154, , 159, , 160] und anderer Fusionsproteine der Klasse I, wie dem HA des Influenzavirus [69], dem gp41 des HIV-1 [75] und dem Fusionsprotein der Paramyxoviren [161] sehr ähnlich. Für SARS-CoV konnte gezeigt werden, dass die Reste 916-950 von HR1 und die Reste 1151- 1185 von HR2 miteinander interagieren [162]. Im linearen Schema des viralen S-Proteins wird deutlich, wie ähnlich die S-Proteine bei Coronaviren der verschiedenen Familien aufgebaut sind (Abbildung 7 E). Das Gen des S-Proteins ist über alle drei Gruppen der Coronaviren hoch konserviert und es wird angenommen, dass für alle Gruppen ein ähnlicher Fusionsmechanismus existiert, der dem allgemeinen Fusionsmechanismus für virale Proteine der Klasse I entspricht [159]. Neben der Aufklärung der Kristallstruktur des Fusionskerns („Coiled-Coil“ aus HR1 und HR2) von SARS-CoV und MHV [159, , 160, , 163, , 164] konnte kürzlich eine kryoelektronenmikroskopische 3D-Rekonstruktion des SARS-Virus Partikels angefertigt werden (Abbildung 7 A-D) [165]. In neuesten kristallographischen Studien gelang die Charakterisierung der Interaktion des ACE2-Rezeptors mit der Rezeptorbindungsdomäne des S-Proteins (Abbildung 7 C und D) [165, , 166]. Die durchschnittliche Anzahl der S-Proteine pro SARS-CoV liegt bei 65 (Abbildung 7 A). Diese Zahl kommt der durch biochemische Studien berechneten von 66.7 sehr nahe [167]. In aktuellen Studien zur Fusion von SARS-CoV wurde sowohl ein Einfluss des pH-Werts [59, , 168, , 169] als auch die Interaktion mit einem entsprechenden Rezeptor für die Auslösung der Fusion verantwortlich gemacht [59, , 168, , 170, , 171].

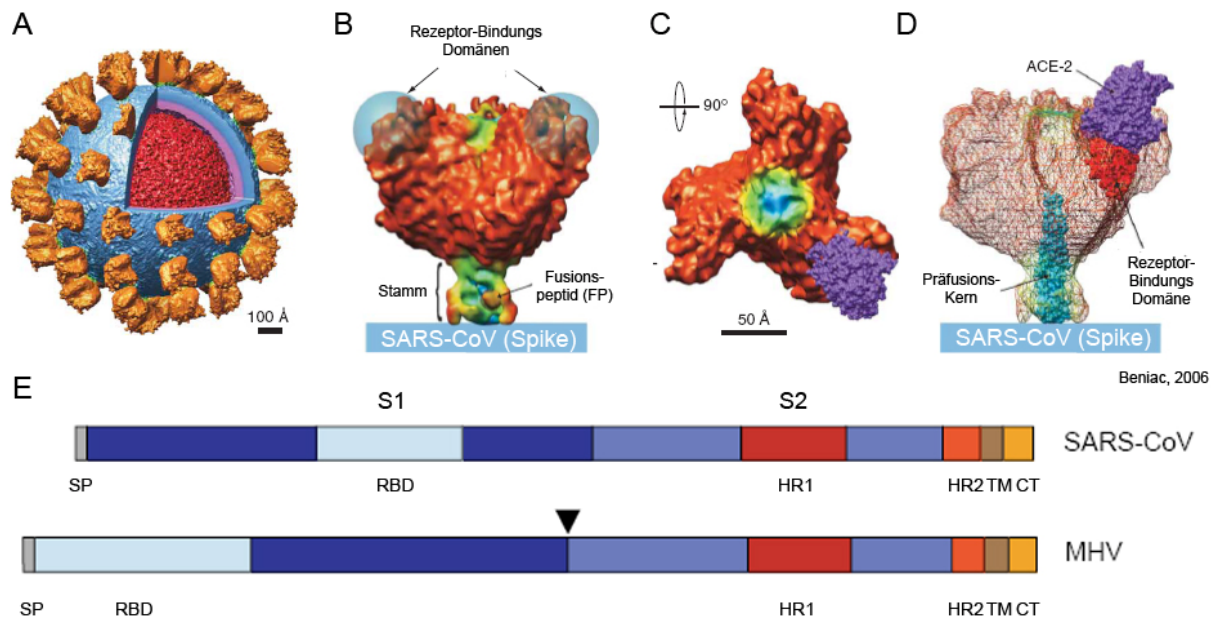


Abbildung 7: Das S-Protein der Coronaviren [165, , 171] . (A) Dreidimensionale (3D)-Rekonstruktion von SARS-CoV. Orange – S-Protein, blau/pink – virale Hüllmembran, rot - Nukleokapsid. (B) Das S-Protein mit den möglichen Rezeptorbindungsdomänen für ACE2 und der Stammdomäne mit den mutmaßlichen Fusionspeptiden. (C) „Top-View“ auf das S-Protein mit gebundenem ACE2-Rezeptor (lila). (D) Lage des Fusionskerns aus HR1 und HR2 (PDB-2FXP [172]) im Inneren der Proteinstruktur. Bindung des ACE2-Rezeptors (lila) an die Rezeptorbindungsdomäne (PDB-2AJF [166]) (rot) des S-Proteins. Kolorierung nach zylindrischer Tiefe. (E) Lineares Schema der S-Proteine von SARS-CoV und MHV. Pfeil: Proteolytische Spaltungsstelle zwischen S1 und S2-Untereinheit [171] . SP- Signalpeptid, RBD - Rezeptorbindungsdomäne, HR - Heptad-Repeat, TM - Transmembrandomäne, CT - cytoplasmatische Domäne.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass die S-Protein-vermittelte Zell-Zell-Fusion keine pH-Aktivierung benötigt [173, , 174] . Dies spricht für eine Aktivierung der Konformationsumwandlung durch S-Protein-Rezeptorinteraktion bei neutralem pH-Wert. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass neben der Rezeptorbindung eine anschließende proteolytische Spaltung des S-Proteins im sauren Milieu des Endosoms stattfinden muss, um eine erfolgreiche Fusion und Infektion zu ermöglichen [6] . Berücksichtigt man die neuesten Erkenntnisse zur S-Protein vermittelten Fusion von SARS-CoV und MHV-2 lässt sich ein neues Modell der Fusion erstellen: Im nativen/metastabilen Zustand liegt das S-Protein als Trimer vor und die HR2-Region bildet α -helikale Strukturen aus, die den Stamm des Proteins bilden. Die HR1-Domänen liegen in „Random-Coil“ Konformation vor, die von der S1-Domäne bedeckt werden. Nach Rezeptorbindung wird das Virus über den endozytotischen Weg in die Zelle aufgenommen. Anschließend erfolgt der Transport vom frühen zum späten Endosom und es kommt durch die Aktivität der endosomalen Protease Cathepsin zur Spaltung des S-Proteins in S1 und S2-Untereinheit. Erst durch diesen Mechanismus kann die endgültige Fusionsreaktion ausgelöst werden. Die S1-Untereinheit dissoziiert und parallel finden in der S2-Untereinheit strukturelle Veränderungen statt, die eine Exposition der Fusionspeptide zur Folge hat. Diese können nun in die Zielmembran eintauchen.

Anschließend bildet HR1 Trimere aus, wogegen die HR2-Trimere zu Monomeren dissoziieren. Dadurch kann sich die fusionskompetente „Sechs-Helix-Bündel“-Struktur ausbilden. Virale und zelluläre Membran kommen in enge Nachbarschaft, was die Hemifusion auslöst. Anschließend bildet sich die Fusionspore aus. Nach vollständiger Fusion kann das virale Nukleokapsid in das Cytoplasma der Zelle entlassen werden.

A.4.3.2 Das S-Protein von MHV-A59

Das S-Protein von MHV-A59 wird im ER der Wirtszelle synthetisiert und oligomerisiert zu Trimeren. Ein Teil des S-Proteins wird zur Zelloberfläche transportiert, wo es abhängig vom Zelltyp zur Zell-Zell-Fusion und Ausbildung von Synzytien kommen kann. Im Viruspartikel selbst besteht das 1,324 Aminosäuren (AS) lange S-Protein (Abbildung 7 E) aus der N-terminalen Ektodomäne (1,263 AS), die stark glykosyliert ist, der hydrophoben Transmembrandomäne (29 AS) und einer kurzen hydrophilen C-terminalen intraviralen Domäne (32 AS). Im Zuge der Proteinreifung wird das S-Protein im Golgi-Apparat von einer zelleigenen Furin-ähnlichen Protease in S1- und S2-Untereinheit gespalten [151, , 152] . Die Untereinheiten S1 und S2 bleiben nichtkovalent verbunden. Die S1-Untereinheit ist für die CEACAM1a-Rezeptorbindung und die S2-Untereinheit für die Auslösung der Fusionsreaktion [175] verantwortlich. Neben der Transmembran- und C-terminalen Domäne beinhaltet die S2-Untereinheit das Fusionspeptid und die HR1- und HR2-Sequenzen. Diese bilden wie andere virale Fusionsproteine der Klasse I die „Coiled-Coil“ Struktur aus [154, , 159, , 163] . Es gibt Hinweise auf verschiedene Auslöser der Konformationsumwandlung im S-Protein von MHV-A59. Detaillierte Modelle der S-Protein-vermittelten Fusionsreaktion von MHV-A59 existieren noch nicht.

A.4.4 Das Fusionspeptid der Coronaviren

Für Coronaviren wird vermutet, dass die S2-Untereinheit das Fusionspeptid beinhaltet. Die S2-Untereinheit besitzt folgende charakteristische strukturelle Eigenschaften [87, , 102, , 105, , 112] : (i) ein Fusionspeptid [176, , 177] , (ii) zwei längere α -Helices, typischerweise 4,3–hydrophobe HR-Sequenzen [154, , 159] und (iii) eine Ansammlung aromatischer Aminosäuren proximal zur (iv) hydrophoben Transmembrandomäne. Vermutlich reicht allein die Insertion der Fusionspeptide in die Zielmembran aus, um eine Destabilisierung dieser zu induzieren und die anschließende Fusion auszulösen [116, , 178, , 179, , 180] . Aufgrund ihrer starken Neigung mit Membranen zu interagieren, ist es möglich hydrophobe Proteinsequenzen, wie Fusionspeptide, über die Hydrophobizitätsskala von Wimley und White (WWIH) zu identifizieren [181] .

Bislang ist es noch nicht gelungen das Fusionspeptid von MHV-A59 zu identifizieren. Im Vergleich zu SARS-CoV handelt es sich beim Fusionspeptid von MHV-A59 vermutlich um ein intern lokalisiertes Fusionspeptid nahe der HR1-Region. Aufgrund von Mutationsstudien wurden bereits drei geeignete Fusionspeptidkandidaten PEP-1-3 für MHV identifiziert [176, , 182] . Sie scheinen eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der Zell-Zell-Fusion zu spielen.

B. Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist die Aufklärung der S-Protein-vermittelten Fusion von Coronaviren und die Identifizierung des Infektionsweges von MHV-A59. Die ersten Schritte der viralen Infektion sind die Bindung und die anschließende Fusion von Virus- und Targetmembran. Für Coronaviren wie MHV-A59 und SARS-CoV steht bis heute eine vollständige Aufklärung des Infektionsweges sowie der Bedingungen, die zu einer Fusion führen, aus.

Zur Identifizierung des Infektionsweges von MHV-A59 sollte der Effekt inhibitorischer und lysosomotroper Substanzen, die die Endozytose hemmen oder die Ansäuerung zellulärer Organellen verhindern, getestet werden. Die vermeintliche Rolle endosomaler Cysteinproteasen bei der Auslösung der Fusion sollte für MHV-A59 untersucht werden. Cholesterolreiche Membrandomänen (Rafts) scheinen beim Eintritt von MHV-A59 eine Rolle zu spielen. Dazu werden Cholesterol-bindende/-komplexierende Substanzen und ihr Effekt auf die Infektivität von MHV-A59 getestet. Epifluoreszenz- und konfokalmikroskopische Untersuchungen zur Virus-Zell- und Zell-Zell-Fusion sollen Aufschluss über den Verlauf der Fusion geben. In biophysikalischen Messungen sollen die Bedingungen einer effektiven Fusion charakterisiert werden. Zum besseren Verständnis der Wechselwirkung zwischen dem S-Protein und dessen zellulären Rezeptor sowie zur Aufklärung der verschiedenen Struktureigenschaften und Konformationen sollten in Zusammenarbeit mit K.Ludwig und C.Böttcher von der FU-Berlin die 3D-Strukturen des S-Proteins und intakter MHV-A59 Partikel erstmalig elektronen- und kryoelektronenmikroskopisch aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen ferner detaillierte Untersuchungen zum Mechanismus des durch das S-Protein von SARS-CoV vermittelten Fusionsprozesses durchgeführt werden. Dazu werden Experimente in einem eukaryotischen Expressionssystem durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Bedingungen, bei der eine erfolgreiche Zell-Zell-Fusion ACE2-Rezeptor- und S-Protein-exprimierender Zellen ausgelöst werden kann, soll im Detail untersucht werden. Verschiedene Varianten des viralen Fusionsproteins sollen biochemisch, biophysikalisch und elektronenmikroskopisch charakterisiert werden.

Die Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59 soll im abschließenden Teil der Arbeit erfolgen, da Fusionspeptide im Verlauf des Fusionsprozesses eine essentielle Rolle übernehmen. Durch die Erstellung von Hydrophobizitätsplots, Sequenzabgleichen mit bekannten Fusionspeptiden anderer Viren und nach Analyse der Sekundärstrukturen definierter Fusionspeptidkandidaten soll eine Auswahl an Fusionspeptiden ermittelt bzw. Vorhersage gegeben werden, die die Basis für zukünftige experimentelle Untersuchungen bilden sollen.

C. Material und Methoden

C.1 Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roche (Mannheim, Deutschland).

Als Standardpuffer wurde PBS (Phosphatpuffer), pH 7.4, mit 156 mM NaCl und 5.8 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ eingesetzt. PBS+ enthielt zusätzlich 2 mM Mg^{2+} / 2 mM Ca^{2+} und wurde von Biochrom KG (Berlin, Deutschland) bezogen. Für Messungen bei Werten unter pH 6 wurde Natriumacetat (NaAc)-puffer (150 mM NaCl, 20 mM Natriumacetat Trihydrat, pH 7.4) verwendet. Die Zusammensetzung anderer Puffer, die nur für bestimmte Präparationen verwendet wurden, wird in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

Für die Zellkultur wurde DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) von Gibco Invitrogen Corporation (Karlsruhe, Deutschland) mit oder ohne Zusatz von unterschiedlichen Mengen an fetalem Kälberserum (FCS; Invitrogen Corporation) verwendet. Der Waschpuffer HANKS-Salts wurde von der Biochrom KG (Berlin, Deutschland) bezogen. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin (50 µg/ml)/EDTA (20 µg/ml)-Lösung (Biochrom KG, Berlin, Deutschland) verwendet. Die Antibiotika wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und Biochrom KG (Berlin, Deutschland) bezogen.

Die Transfektionslösungen Lipofectin® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), PolyFect® (Qiagen, Hilden, Deutschland) und DreamFect™ (OZ Biosciences, Marseille, Frankreich) wurden für die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen verwendet.

Octadecylrhodamin-B-chlorid (R_{18}) und der Acetomethylester des Calceins (Calcein-AM) wurden von Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Von Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) stammen die DOGS-NTA-Ni Lipide (1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[N(5-Amino-1-Carboxypentyl)iminodiAceticAcid] Succinyl (Nickel Salz)) und alle anderen verwendeten Lipide.

Zur Aufreinigung der Proteine wurden NiNTA-Agarose Beads der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) und Protein-G-Sepharose Beads der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) verwendet.

C.2 Biologisches Material**C.2.1 Viren****Tabelle 7: Viren**

<i>Virus</i>	<i>Stamm</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Quelle</i>
MHV-A59	Ohio 1999	-	Prof. J. Ziebuhr, Würzburg, Deutschland
MHV-S4	MHV-A59	rekombinanter MHV-Stamm S-Protein von JHM exprimierend	P. J.M. Rottier, Utrecht, Niederlande
MHV-A59 FI	Ohio 1999	MHV-A59 mit ungespaltenem S-Protein	P. Eifart
VSV	Indiana	-	K. Ludwig
Influenza A	X-31	-	-
Vakziniavirus (VV)	VTF7.3	rekombinantes VV, T7-Polymerase exprimierend	Prof. M.F.G. Schmidt, Berlin, Deutschland

C.2.2 Zellen**1. Humane Erythrozyten (Charité, Berlin, Deutschland)****2. Eukaryotische Zellen****Tabelle 8: Eukaryotische Zellen**

<i>Zelllinie</i>	<i>Organismus</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Organ</i>
17Cl-1*	Maus	Mus musculus, Derivat der Balb3T3/c Zelllinie	Fibroblast, Embryo
DBT **	Maus	Mus musculus	murine Astrocytoma, Nervengewebe
LR-7**	Maus	Mus musculus, Derivat der L-Zellen	Fibroblast, Bindegewebe
HEK293T	Mensch	Homo Sapiens	Fibroblast, Niere, Embryo
NCTC 929 (L929)***	Maus	Mus musculus	Fibroblast, Bindegewebe
NCTC 1469***	Maus	Mus musculus	Epithel, Leber
VeroE6[#]	Affe	Cercopithecus aethiops	Fibroblast, Niere
BHK-21	Hamster	Mesocricetus auratus	Fibroblast, Niere

*17Cl-1 Zellen – J. Ziebuhr, Würzburg, Deutschland, DBT und LR-7 Zellen – P. J.M. Rottier, Utrecht, Niederlande, ***NCTC 929 und 1469 Zellen – ECACC. [#]VeroE6-Zellen – M. Veit, FU Berlin, Deutschland

C.2.3 Bakterien**Tabelle 9: Bakterien**

<i>Stamm</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Quelle</i>
<i>E. coli</i> CMK603	thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 hsdR _k hsdM _k Δlac-pro F [traD6 proAB ⁺ lacZΔM15]	K. Rand, Cambridge
<i>E. coli</i> Xli-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ⁺ proAB lacI ^q ΔM15(lacZ) Tn10 (tet ^r)]	Stratagene (La Jolla, CA, USA)

C.3 Eukaryotische Zellkultur

Alle Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc, Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland), Greiner Bio One (Frickenhausen, Deutschland), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) und Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Die Medien DMEM und MEM wurden bei Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) oder MEM bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

C.3.1 Passagieren eukaryotischer Zellen

Je nach Zelltyp erreichen eukaryotische Zellen in Kultur bei 90-95% ihre Konfluenz und müssen umgesetzt werden, da sie sonst absterben. Zur Kultivierung werden die Zellen von der Zellkulturschale gelöst, vereinzelt, verdünnt und ausplattiert. Je nach Zelltyp und Wachstumsbedingungen müssen bestimmte Verdünnungen eingehalten werden.

1. 30 Minuten vorher werden Medien sowie Puffer und Trypsin/EDTA auf 37°C erwärmt.
2. Kontrolle der Zellen und Zelldichte unter dem Lichtmikroskop
3. Absaugen des Mediums
4. 2x mit HANKs-Puffer oder PBS waschen
5. Trypsin (50 µg/ml)/EDTA zugeben und für 5 Minuten bei 37°C/5% CO₂ inkubieren
6. Aufnehmen der abgelösten Zellen in Medium
7. Verdünnung der Zellsuspension
8. Ausplattieren der Zellen in der gewünschten Verdünnung

C.3.2 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zum Einfrieren werden die in Medium aufgenommenen Zellen bei 800 rpm (250 x g) und 4°C zentrifugiert und in eiskaltem Wachstumsmedium mit 5-10% DMSO aufgenommen. Aliquots werden in gekühlte Kryoröhrchen überführt, für 24 Stunden bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff (N₂) überführt.

Zum Auftauen der Zellen werden die Kryoröhrchen zunächst im Eisbad inkubiert und anschließend im Wasserbad bei 37°C vollständig aufgetaut. Um Kontaminationen zu vermeiden, wird das Röhrchen mit 70% EtOH oder Isopropanol gesäubert. Die Zellen werden in frisches Wachstumsmedium überführt, zentrifugiert, erneut in frischem Medium aufgenommen und ausplattiert.

C.4 Molekularbiologie

Alle Lösungen, Puffer und Restriktionsenzyme für die Molekularbiologie wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Qiagen (Hilden, Deutschland), Marligen Biosciences Inc. (Ijamsville, MD, USA), NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) und GE Healthcare (München, Deutschland) erworben. Die Antibiotika wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) und Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

C.4.1 Bakterienkultur

C.4.1.1 Vorkultur

Mit sterilen Zahnstochern/Pipettenspitzen werden einzelne Kolonien von der Platte gepickt und zunächst in 5 ml LB-Medium (mit Antibiotika) überführt. Die Inkubation bei 37°C erfolgt für mind. 8 Stunden und 160 rpm bis eine deutliche Trübung des Mediums zu erkennen ist. Die Vorkultur wird je nach Ansatz für eine Mini- oder Maxi-DNA-Präparation weiter verwendet. Für eine Maxi-Präparation wird ein Teil der Vorkultur in 200-500 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) überführt und ü.N. bei 37°C schüttelnd inkubiert.

C.4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Bakterien

Zur Aufbewahrung transformierter Bakterien wird ein Glycerol- oder DMSO-Stock angelegt. Dazu werden 900 µl einer Vorkultur entweder mit 100 µl Glycerol (96%) oder 100 µl DMSO (100%) versetzt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Aufbewahrung erfolgt bei -80°C.

Das Auftauen erfolgt auf Eis. Um das überschüssige DMSO zu entfernen werden die Zellen mit vorgewärmtem LB-Medium gewaschen und zentrifugiert. Das Sediment wird erneut in LB-Medium aufgenommen und eine entsprechende Kultur (10-500 ml) angeimpft. Der Zentrifugations- und Waschschrift entfällt bei der Konservierung mit Glycerol.

C.4.2 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien (Tabelle 9) (100 µl) werden mit 20 ng – 1 µg zirkulärer Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden sie bei 42°C für 45 Sekunden einem „Hitzeschock“ ausgesetzt. Anschließend wird der Ansatz in 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) überführt und für 1 Stunde bei 160 rpm und 37°C schüttelnd inkubiert. Die Vorkultur wird abzentrifugiert, das Bakterienpellet in ca. 50 µl resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

C.4.3 Aufreinigung der Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Leervektoren wurden in Tabelle 10 zusammengestellt. Die Plasmide und der Leervektor pCDNA3.1 myc/His A weisen jeweils eine Ampicillin-Resistenz auf, wogegen der Vektor EYFP-N1 eine Kanamycin-Resistenz besitzt.

Tabelle 10: Vektoren und Plasmide

Plasmide	Quelle
pCDNA3 S-Full*	[173]
pSecTag2B S-Ekto	[173]
pCDNA3.1 (+) ACE2-Full C9**	[156]
pCDNA 3.1 (+) ACE2-Ekto C9**	[156]
Leervektoren	Quelle
pCDNA3.1 myc/His A***	M. Veit FU-Berlin (Invitrogen)
EYFP-N1***	M. Veit FU-Berlin (Clontech)

*S-Protein – [173] , **ACE2-Rezeptor – [156] , ***M. Veit, FU-Berlin, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Clontech (Mountainview, CA, USA).

C.4.3.1 Plasmid-DNA Mini-Präparation

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA werden kleine Säulen der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die Präparation erfolgt nach Herstellerangaben. Aus 1-1.5 ml Bakterienkultur können 1-15 µg reiner Plasmid-DNA isoliert werden.

C.4.3.2 Plasmid-DNA Maxi-Präparation

Zur Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA werden Säulen der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) oder Marligen Biosciences Inc. (Ijamsville, MD, USA) verwendet. Die Präparation erfolgt nach Herstellerangaben. Nach Aufreinigung von 250-500 ml einer Übernachtskultur können 500-800 µg Plasmid-DNA isoliert werden.

C.4.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsgrad aufgereinigter DNA

Durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer DNA-Lösung bei 260 nm kann deren Konzentration bestimmt werden. Zur Feststellung des Verunreinigungsgrades durch Proteine wird zusätzlich das Verhältnis der OD bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Ein optimaler Reinheitsgrad liegt zwischen 1.8 und 2.0. Zur Verifizierung des Plasmids werden zusätzlich Restriktionsstudien durchgeführt. Nach Inkubation der Plasmid-DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen in dem vom Hersteller angegebenen Puffer werden DNA und Enzyme für mind. 2 Stunden bei 37°C

inkubiert und anschließend über Agarosegelelektrophorese überprüft. Die verwendeten Restriktionsenzyme mit den entsprechenden Schnittstellen wurden in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Schnittstelle
Apa I	5'-G G G C C [^] C-3' 3'-C [^] C C G G G-5'
BamHI	5'-G [^] A G A T C C-3' 3'-C C T A G [^] G-5'
EcoRI	5'-G [^] A A T T C-3' 3'-C T T A A [^] G-5'
XbaI	5'-T [^] C T A G A-3' 3'-A G A T C [^] T-5'

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

C.4.5 Klonierung der Plasmid-DNA

Die aufgereinigte Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Gen wird zunächst mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Der Zielvektor wird ebenfalls mit diesen Enzymen inkubiert. Zur Überprüfung des Restriktionsverdaus und für die anschließende Gelextraktion wird ein 1% Agarosegel angefertigt. Das Insert und der Zielvektor wurden über die Gelextraktionsreaktion und anschließende Säulenaufreinigung (Qiagen, Hilden, Deutschland) eluiert. Um die Effizienz der Ligation zu erhöhen, wird der Zielvektor anschließend mit der alkalischen Phosphatase (SAP) im entsprechenden Puffersystem nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Anschließend erfolgt die Ligation mit dem „Rapid-DNA-Ligations-Kit“: Insert und dephosphorylierter Zielvektor werden nach Herstellangaben 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in kompetente Bakterien transformiert und ausplattiert. Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum werden ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Überprüfung der Klonierung werden am folgenden Tag mind. 10 Kolonien gepickt und jeweils 1-1.5 ml Kultur angeimpft. Zur Isolierung der DNA dient die Mini-DNA-Präparation. Die Größe der isolierten DNA wird über Agarosegelelektrophorese überprüft. Ein positiver Klon wird amplifiziert und mittels Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese überprüft. Zudem wird die Expression des Proteins im eukaryotischen Zellsystem überprüft. Die gefärbten Gele werden mit der Desaga®-Videodokumentationsanlage digitalisiert und mit Hilfe der Desaga®-View Software ausgewertet.

C.5 Expression rekombinanter Proteine im eukaryotischen Zellsystem

Zur Expression des S-Protein von SARS-CoV und dessen Chimären in HEK293T-Zellen und des ACE2-Rezeptors und dessen Chimären in VeroE6-Zellen wird ein auf VTF7.3-basierendes

Expressionssystem verwendet. Die exprimierten Proteine werden entweder aufgereinigt oder für fluoreszenzmikroskopische Fusionsexperimente genutzt.

C.5.1 Transfektion eukaryotischer Zellen

Je nach Herstellerangaben werden zunächst DNA-Liposomen-Gemische angefertigt. Das Zellmedium ohne Zusätze wie Antibiotika oder FCS (D0-) wird jeweils mit DNA oder dem entsprechenden Transfektionsreagenz (Lipofectin®, PolyFect® oder DreamFect™) versetzt und das Gemisch 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transfektion werden die Zellen 2x mit Wachstumsmedium gewaschen und anschließend für mindestens 4 Stunden mit dem DNA-Liposomen-Gemisch bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach 4 Stunden sollte die Plasmid-DNA in die Zelle aufgenommen worden sein. Steht das zu exprimierende Gen unter Kontrolle des T7-Promotors, werden die Zellen vor der Transfektion zusätzlich mit dem rekombinanten Vakziniavirus VTF7.3, das die T7-RNA-Polymerase exprimiert, infiziert. Nach Infektion der Zellen mit dem Virus kommt es zum Erliegen der zellulären Proteinsynthese, und es werden ausschließlich virale Gene und damit die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Somit steht eine ausreichende Menge an T7-Polymerase zur effizienten Transkription des T7-Expressionsplasmids zur Verfügung. Nachteil dieses Systems ist, dass die Vakziniavirusinfektion zu einem starken cytopathischen Effekt und damit zum Zelltod führt. Eine dauerhafte Expression und längere Inkubation der Zellen ist also nicht möglich.

Tabelle 12: Verwendete Plasmide und exprimierte Proteine

Plasmid	Protein	Beschreibung	T7-Promotor
pCDNA3 S-Full*	S-Full	SARS-CoV S-Protein Volllänge	+
pSecTag2B S-Ekto*	S-Ekto	SARS-CoV S-Protein Ektodomäne	+
pCDNA3.1 (+) ACE2-Full C9**	ACE2-Full	ACE2-Rezeptor (human) mit C9-Peptid	+
pCDNA 3.1 (+) ACE2-Ekto C9**	ACE2-Ekto	ACE2-Rezeptor (human) Ektodomäne mit C9-Peptid	+

*S-Protein – [173] , **ACE2-Rezeptor – [156] .

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Varianten des S-Proteins von SARS-CoV: S-Full und -ekto, sowie zwei Varianten des ACE2-Rezeptors: ACE2-Full und -Ekto exprimiert (Tabelle 12). Die Volllängenvarianten (-Full) enthalten neben der Sequenz für die Ektodomäne zusätzlich die Sequenzen für Transmembran- und cytoplasmatische Domäne und werden membranverankert exprimiert. Die Varianten der Ektodomänen beider Proteine dagegen werden in das Zellmedium sezerniert. Alle verwendeten Plasmide stehen unter Kontrolle des T7-Promotors. Außerdem wird

die in dieser Arbeit klonierte Volllängenvariante des S-Proteins von SARS-CoV – pCDNA3.1 myc/His A in HEK293T-Zellen exprimiert und aufgereinigt.

C.5.2 Expression, Isolierung und Analyse der Proteine

Die in Tabelle 12 aufgeführten Proteine werden als membranverankerte oder sezernierte Varianten im eukaryotischen Zellsystem exprimiert.

C.5.2.1 Isolierung der Volllängenvarianten

Die Volllängenvarianten des S-Proteins von SARS-CoV: pCDNA3 S-Full und pCDNA3.1 myc/His S-Full werden wie beschrieben in HEK293T-Zellen exprimiert (siehe C.5.1). Die Variante des ACE2-Rezeptors – pCDNA3 ACE2-Full-C9 wird sowohl in HEK293T als auch in VeroE6-Zellen exprimiert. Die Expression der membranverankerten Proteine erfolgt für höchstens 24 h bei 5%CO₂ und 31°C. Die Zellen werden anschließend mit dem detergenthaltigen RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM HNa₂O₄•PH₂O pH 7.2, 0.5 mM PMSF) solubilisiert. Zur Vermeidung der proteolytischen Degradation wird ein 1x Proteaseinhibitorcocktail (1000x: Aprotinin (1 mg/ml), Leupeptin (1 mg/ml), Pepstatin 1 mg/ml, Antipain 5 mg/ml, Benzamidin 157 mg/ml in DMSO) zugesetzt.

C.5.2.2 Isolierung sezernierter Proteinvarianten

Die verkürzten Varianten des S-Proteins und ACE2-Rezeptors: pSecTag-2B S-Ekto und pCDNA3 ACE2-Ekto-C9 werden nach erfolgreicher Expression in HEK293T- und/oder VeroE6-Zellen in das Zellmedium sezerniert. Das proteinhaltige Medium wird von den Zellen abgenommen, sofort mit Proteaseinhibitoren versetzt und zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Zur Konzentrierung werden die Überstände mittels Centricon C-100 mit einem Cut-Off von 100 kDa für das S-Protein oder einem Cut-Off von 30 kDa für den ACE2-Rezeptor bei 1000 x g und 4°C für mehrere Runden jeweils 10 Minuten zentrifugiert, bis ein Endvolumen von ca. 1 ml erreicht ist.

C.5.2.3 Aufreinigung der Proteinvarianten mit (His)₆-Tag

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene S-Proteinvarianten mit (His)₆-Tag exprimiert. Die Ernte erfolgt wie beschrieben und die anschließende Aufreinigung wird entweder über NiNTA-Agarose Beads (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder mittels Ni-HiTrap-Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland) über die Äkta-Anlage (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Elution der Proteine mit der entsprechenden

Imidazolkonzentration (300-500 mM) werden die Proben für mindestens 16 h gegen Na-Acetatpuffer (150 mM NaCl, 20 mM Acetat, pH 7.4) dialysiert, um das Imidazol zu entfernen. Die Proteinproben werden ferner in C-100 Centricons (Millipore, Schwalbach, Deutschland) konzentriert und anschließend sofort für die Elektronenmikroskopie verwendet.

C.5.2.4 Aufreinigung der Proteinvarianten ohne Tag

Die Aufreinigung des ACE2-Rezeptors erfolgt mittels Immunopräzipitation (IP) mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers anti-hACE2 (Tabelle 13, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Dazu wird das Immunopräzipitations-Kit von GE Healthcare (München, Deutschland) mit entsprechenden Protein-G-Sepharose Beads benutzt. Im ersten Schritt werden Proteine (Antigen) und Antikörper bei 4°C für mind. 1 Stunde inkubiert, anschließend die Antikörper-bindenden Protein-G-Sepharosebeads hinzu gegeben und weiter bei 4°C inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation liegen die Antigen-Antikörper-Komplexe am Protein-G-Sepharose-Sediment gebunden vor und können nach Denaturierung im reduzierenden SDS-Probenpuffer über Westernblot detektiert werden.

C.5.3 SDS-PAGE und Native Gelelektrophorese

Zur Identifizierung der Proteine wird eine SDS-PAGE unter Verwendung des Minigel-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Unter reduzierenden Bedingungen werden je 50 µl Probe mit je 12.5 µl Probenpuffer (0.5 M Tris, pH 6.8, 5 % SDS, 25 % Glycerol, 0.05 % Bromphenol blau, 25% β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 96°C inkubiert. Unter nicht-reduzierenden/nativen Bedingungen werden je 50 µl Probe mit je 12.5 µl Probenpuffer (0.5 M Tris, pH 6.8, 25 % Glycerol, 0.05 % Bromphenol blau) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Bei nicht-reduzierenden Gelen enthalten die verwendeten Puffer oder Gele kein SDS. Pro Geltasche eines 10-12%igen Polyacrylamidgels werden jeweils 10-30 µl der entsprechenden Probenlösung aufgetragen. Die Proteinbanden werden mittels Coomassie- oder Silberfärbung visualisiert. Die digitale Dokumentation der gefärbten Gele erfolgt mit der Desaga®-Videodokumentationsanlage und mit Hilfe der Desaga®-View Software.

C.5.4 Westernblotanalyse

Für die Westernblotanalyse werden die Proteine zunächst ihrer Größe nach über ein reduzierendes SDS-Gel aufgetrennt. Das Blotten erfolgt nach Herstellerangaben des „ECL+ Western-Blotting Detection Kits“ wie folgt:

1. Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Hybond ECL (PVDF) – Membran
2. Block der unspezifischen Bindungsstellen mit Blockingpuffer
3. Primärer Antikörper
4. HRP-gekoppelter Sekundärantikörper
5. ECL+ Detektionsreagenz
6. Exposition auf einen lichtempfindlichen ECL+ Film
7. Entwicklung des Films
8. Dokumentation

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

Antikörper	Epitop	Organismus	Verdünnung	Quelle
anti-SARS S-Full #IMG-542	S-Protein SARS CoV	Kaninchen	1:2500	IMGEX Corp, San Diego, CA, USA
anti-c-myc	c-myc-Tag	Maus	1:2500 – 1:5000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti-hACE2	hACE2-Rezeptor	Maus	1:500	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
anti-(His) ₆ -Tag	(His) ₆ -Tag	Maus oder Kaninchen	1:1000	Dianova, Heidelberg, Deutschland

Zum Nachweis der Varianten von S- und ACE2-Rezeptorprotein werden die in der Tabelle 13 aufgeführten Antikörper benutzt. Als Sekundärantikörper wird der im „ECL+ Westernblotting-Detection Kit“ enthaltene polyklonale HRP-gekoppelte Antikörper verwendet.

C.6 Viruszucht

C.6.1 Zucht von Influenzaviren

Die Zucht von Influenzaviren erfolgt in befruchteten und 11 Tage bebrüteten Hühnereiern. In die Allantoishöhle der Eier werden je 100 µl einer voreingestellten Virus-Suspension (10^{-2} - 10^{-1} HAU/ml) inokuliert. Die Inkubation der infizierten Eier erfolgt für 2 Tage bei 37°C und zur Abtötung der Embryonen über Nacht bei 4°C. Nach Entfernung der Eierschale im Bereich der Luftkammer wird die virushaltige Allantoisflüssigkeit entnommen.

C.6.2 Zucht von MHV

MHV-A59 und MHV-S4 werden in 17Cl-1 Zellen gezüchtet [183]. Die 17Cl-1 Mausfibroblastenzellen werden in T175-Zellkulturflaschen in DMEM mit 10% FCS (D10) bis zur Konfluenz bei 5% CO₂ und 37°C vermehrt und bei einer MOI von 10 PFU/Zelle des jeweiligen Virus inokuliert. Für die Aufzucht von MHV-A59 mit ungespaltenem S-Protein (MHV-A59 FI) werden die Zellen mit dem Furininhibitor (FI) Peptidyl-Chloromethylketon (dec-RVCR-cmk) bei einer Konzentration von 75 µM vorinkubiert und anschließend mit MHV-A59 bei einer MOI von 10 PFU/Zelle in der Anwesenheit des Inhibitors infiziert. Vor der Infektion wird das Wachstumsmedium abgenommen und die Zellschicht 2x mit DMEM 2%-FCS (D2) gewaschen. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und regelmäßigem Schütteln der Zellkulturflaschen (all 10 Minuten) werden 20 ml Infektionsmedium (D2) zugegeben. Die inokulierten Zellen werden bei 37°C/5 % CO₂ für 46-48 h inkubiert.

C.6.3 Zucht von VSV

VSV wird auf BHK-21 Zellen gezüchtet. Die BHK-21 Zellen werden bis zur Konfluenz in T175-Zellkulturflaschen oder Ø 15 cm Petrischalen in MEM mit 10% FCS (M10) angezüchtet und vermehrt. Für die Viruszucht werden die Zellen bei einer MOI von 0.1 PFU/Zelle in MEM mit 2% FCS-haltigem Medium (M2) infiziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 20 ml M2 hinzugegeben und die inokulierten Zellen bei 37°C/5% CO₂ für 16-24 h inkubiert.

C.7 Virusaufreinigung

C.7.1 Aufreinigung des Influenzavirus

Zur Aufreinigung der gezüchteten Viren wird zunächst die Allantoisflüssigkeit bzw. das Erhaltungsmedium 30 min bei 1,000 x g und 4°C zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Durch Ultrazentrifugation bei 100,000 x g (1.5 h, 4°C) werden die Virionen sedimentiert und anschließend in einem geringeren Volumen PBS resuspendiert. Daraufhin werden die Viren über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (60 %, 40 %, 20 % w/v Saccharose in HNE-Puffer, pH 7.4: 5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) geschichtet und 16 h bei 100,000 x g, 4°C zentrifugiert. Die sichtbare Virusbande wird abgenommen und im dreifachen Volumen PBS gewaschen (100,000 x g, 1h, 4°C). Zuletzt werden die Viren in PBS aufgenommen und bei -80°C gelagert.

C.7.2 **Aufreinigung der Maushepatitisviren und Isolierung des S-Proteins**

Die Aufreinigung der verschiedenen MHV-Varianten: -A59, -S4 und -A59 FI erfolgt nach dem Protokoll von Sturman und Takemoto [183] mit einigen Modifikationen von Tsai et al. [184]. Das virushaltige Medium wird 46-48 h nach der Infektion (p.i.) von den Zellen abgenommen und sofort für 30 Minuten und 4°C im Beckman JA 25.5 Rotor (Beckman, Krefeld, Deutschland) bei 10,000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Nuklei zu entfernen. Zur Erstellung des Polyethylenglycol (PEG)-Präzipitats (PEG-Präzipitat) werden dem gereinigten Überstand anschließend 2.2% NaCl und 10% PEG-8000 (Promega, Mannheim, Deutschland) zugeführt. Dieser wird anschließend bei 4°C unter ständigem Rühren für 4 Stunden inkubiert und erneut bei 10,000 x g und 4°C zentrifugiert. Das virushaltige Pellet wird in BisTris-Puffer (150 mM NaCl, 25 mM BisTris, pH 6.5) aufgenommen, über einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (30% und 50% (w/w)) geschichtet und für 16 Stunden in einem Beckman SW40 Ti Rotor über Nacht bei 4°C und 28,000 rpm (110,000 x g) in der Ultrazentrifuge (UZ) zentrifugiert. Die Virusbande an der Phasengrenze zwischen 30% und 50% Saccharose wird in BisTris-Puffer (pH 6.5) aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Viren die 46-48 p.i. geerntet werden, besitzen einen Titer von $1-2 \times 10^9$ pfu/ml auf. Für die Experimente werden die Viren für mehrere Stunden bei 4°C gegen BisTris-Puffer pH 6.5 mit 5% Glycerol dialysiert, um die Saccharose zu entfernen. Dazu wird ein Dialyseschlauch mit einem MWCO von 12-14 kDa (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Isolierung des S-Proteins aus intakten Virionen müssen diese zunächst mit einem detergenzhaltigen Lysepuffer, der das nichtionische Detergenz NP-40 enthält, solubilisiert werden. Dazu werden 1 ml dialysierter Virussuspension mit dem NP40-Lysepuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 1% NP40 erreicht wird. Die Solubilisierung der Viren erfolgt bei 4°C durch Inkubation bei 700 rpm für 30 Minuten. Die behandelten Viren werden anschließend über einen kontinuierlichen 15-50%igen Saccharosedichtegradienten geschichtet und bei 38,000 rpm (180,000 x g), 4°C für 18 h im SW60 zentrifugiert. Um eine Aggregation der Proteine zu vermeiden, beinhaltet die Saccharoselösung stets 0.1% NP-40. Die einzelnen Fraktionen werden mittels des Gradientenfraktionators von oben abgenommen und in vorgekühlte Eppendorfröhrchen überführt. Die Refraktionsindizes der 20-50%igen Saccharoselösungen mit 0.1% NP-40 werden mit einem digitalen Bausch und Lomb Abbé Refraktometer bestimmt. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgt über SDS-PAGE. Die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford et al. [185] betrug 2-3 mg/ml. Die Phospholipidmenge wird nach der Methode von Böttcher et al. [186] bestimmt, nachdem die Lipide nach der Methode von Bligh and Dyer [187] aus den Virosomen extrahiert werden. Das Pellet wird in 1 ml BisTris-Puffer pH 6.5 aufgenommen. Für die kryoelektronenmikroskopische Analysen werden die S-Protein-Fraktionen erneut gegen BisTris-Puffer dialysiert und konzentriert.

C.8 Herstellung von SUV mit Ni-Lipiden

Zur elektronenmikroskopischen Analyse der isolierten Proteinvarianten des S-Proteins (S-Ekto- und S-Full-(His)₆-Tag) von SARS-CoV werden SUV (small unilamellar vesicles) hergestellt, um eine Orientierung der Proteine im Raum zu ermöglichen und eine eventuelle Degradation durch Proteasen auszuschließen. DOGS-NTA Lipide enthalten ein Nickel-Ion (Ni) in der Kopfgruppe. Folgende Lipide wurden für die Herstellung der Ni-haltigen Liposomen (SUV) verwendet:

Tabelle 14: Verwendete Lipide für die Liposomen-Herstellung

Lipid	Stammlösung	Endkonzentration
Lyso-PC	10 mg/ml	0.75 μ M
DOPC	25 mg/ml	0.75 μ g
DOGS-NTA Ni	25 mg/ml	0.15 μ M (10mol%)

Für die Herstellung der SUVs werden die Lipide zunächst in den aufgeführten Konzentrationen (Tabelle 14) als chloroformhaltige Lösungen in ein Reagenzglas überführt, das Lösungsmittel unter Stickstoffzufuhr abgedampft und nach Zugabe von 5 μ l EtOH gevortext. Schließlich wird die Gesamtmenge von 1.5 μ M Lipid mit 10 mol% DOGS-NTA Ni in 500 μ l Na-Acetatpuffer (150 mM NaCl, 20 mM Na-Acetate Trihydrat, pH 7.4, entgast) aufgenommen und auf Eis für 20 Minuten im Branson Sonifier Model W250 (Carouge-Geneve, Genf, Schweiz) im Eisbad mit Ultraschall (Output 4) beschallt. Nach Zentrifugation (1,500 x g, 4°C, 10 min) werden die SUV erneut in Na-Acetatpuffer aufgenommen und sofort verwendet.

C.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die elektronen- und kryoelektronenmikroskopische Analyse der Proben erfolgt in Kollaboration mit C. Böttcher und K. Ludwig vom Zentrum für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin, Deutschland. Zur Charakterisierung und Analyse der Struktur und Konformation des S-Proteins von SARS-CoV und MHV-A59 werden sowohl isolierte Varianten des S-Proteins von SARS-CoV als auch intakte MHV-A59 analysiert.

C.9.1 Kryoelektronenmikroskopie

Ein Tropfen der vorinkubierten Präparatlösung wird auf ein mit Kohlelochfolie überspanntes Elektronenmikroskopie-Grid (200 Maschen, 1 μ m Lochdurchmesser, R1/4 Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland) gegeben, welches vorher mittels einer 60-sekündigen Plasmabehandlung bei 8 W in einer BALTEC MED 020 Anlage hydrophilisiert wurde. Die überschüssige Flüssigkeit wird mittels Filterpapier abgesaugt bis ein ultradünner Film der

Probenlösung entstanden ist, der die Löcher des Karbonfilms überspannt. Die Proben werden über einen Guillotine-ähnlichen Mechanismus unmittelbar in flüssiges Ethan eingeschossen. Die Abkühlrate liegt dabei in der Größenordnung von 10^4 K/s, so dass es zu einem amorphen Gefrieren des Präparatwassers kommt („Vitrifizierung“). Die vitrifizierten Präparate werden mit Hilfe eines Gatan-Kryohalters (Model 626, Gatan Inc., Kalifornien, CA, USA) unter flüssigem Stickstoff in ein Philips CM12 Transmissions-Elektronenmikroskop (FEI Company, Oregon, OR, USA) überführt. Die Mikroskopie wird bei 94 K (-174°C) Probentemperatur unter Anwendung des „Low-Dose“-Protokolls des Mikroskops bei einer Primär-Vergrößerung von 58.300 x und einer Beschleunigungsspannung von 100 kV (LaB₆ – Belichtung) durchgeführt. Der eingestellte Defokus beträgt 1.5 µm.

C.9.2 Elektronenmikroskopie an negativkontrastierten Proben

Ein Tropfen der vorinkubierten Probenlösung wird auf ein befilmtes Grid (hydrophilisierter Kohlefilm auf 400-maschigem Trägernetz) gegeben. Nach 30 Sekunden wird die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapierstreifen abgesaugt und die kontrastverstärkende schwermetallhaltige Färbelösung (1% Phosphorwolframsäurelösung (PTA), pH 7.4) hinzu gegeben und nach 45 Sekunden wieder mit Filterpapier abgesaugt. Anschließend trocknet die Probe an der Luft. Mittels eines Standardhalters wird die getrocknete Probe in ein mit einer LaB₆-Kathode bestücktes Elektronenmikroskop Philips CM12 (FEI Company, Oregon, OR, USA) transferiert. Die Bilder werden bei einem Defokus von 0,6 µm mit einer primären Vergrößerung von 58.300 x bei 100 kV ($C_s = 2$ mm) aufgenommen.

Ein Teil der Aufnahmen (Kryo-TEM und Negativkontrastierung) wird mit dem „Tecnai F20“ (FEI Company, Oregon) wie beschrieben angefertigt.

C.9.3 Rechnergestützte Bildverarbeitung nach der Einzelpartikelmethode

Die elektronenmikroskopischen Negative werden mittels laseroptischer Diffraktion auf Astigmatismus und Drift überprüft. Optisch einwandfreie Negative werden mit einem „Heidelberg Primescan“-Trommelscanner (Heidelberger Druckmaschinen AG, Heidelberg, Deutschland) bei einer nominalen Pixelgröße von 0,68 Å digitalisiert, was einer Scanauflösung von 4 µm entspricht. An den eingescannten Abbildungen der MHV-A59-Virionen werden anschließend einzelne Trimere des S-Proteins interaktiv ausgewählt und aus den digitalisierten Negativen als 400x400 Pixel große Einzelbilder extrahiert. Diese Einzelbilder (ca. 2800 S-Protein-Trimere) werden nach dem Verfahren von Sander et al. hinsichtlich der Kontrastübertragungsfunktion korrigiert [132]. Aus Gründen der Recheneffizienz werden korrigierte Einzelbilder auf 1,37 Å/Pixel Auflösung reduziert. Alle Schritte der Bildverarbeitung erfolgen mit Hilfe der IMAGIC-5 Software (Image Science GmbH,

Berlin, Deutschland) welche unter Linux auf einem Beowulf-Cluster [188] . Zur Berechnung der dreidimensionalen Rekonstruktion der Struktur wird das "angular reconstitution"-Verfahren angewendet [189] . Dazu werden nach Filterung und Normierung der Einzelbilder die inzwischen fest etablierten Verfahren des „Multi-Referenz-Alignment“ [190] , multivariate statistische Analyse und automatische hierarchische Klassifizierung [191] benutzt, um rauschreduzierte Summenbilder typischer Projektionsansichten des Proteins zu erhalten. Die Zuordnung der Raumwinkel („Eulerwinkel“) erfolgt unter Nutzung des „common line projection theorem“ [189] .

C.10 Plaqueassay und Plaquereduktionsassay

Zur Bestimmung des viralen Titers werden die Zellen am Vortag in 6-well Platten ausplattiert. Verschiedene Log-Virus-Verdünnungen werden in D2-Infektionsmedium erstellt. Nachdem die Zellen 2x mit D2-Medium gewaschen wurden, werden jeweils 0.5 ml der Viruslösung für 1 Stunde mit den Zellen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des virushaltigen Überstands werden die Zellen mit 0.75% Oxoid-Agarose-DMEM 2% FCS (Oxoid, Hampshire, UK) überschichtet und 24 – 48 h bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Zur Visualisierung der Plaques (PFU) erfolgt die Färbung der Zellen mit einer 3.3% Neutralrot-Lösung bei 37°C für 1 Stunde. Anschließend wird die Färbelösung entfernt und die Inkubation bei 31°C für 3 Stunden ermöglicht die Entfärbung der Plaques. Die gefärbten Platten werden mit der Desaga®-Videodokumentationsanlage (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) digitalisiert und die PFU mit Hilfe der Desaga®-View Software ausgezählt. Zur Bestimmung des viralen Titers wird folgende Formel (1) verwendet:

$$pfu / ml = pfu \times Verdünnung (10^x) / Volumen (ml)$$

Für den Plaquereduktionsassay (PRA) werden die Zellen vor der Inokulation mit dem Virus für 30 min mit lysosomotropen Agenzien, endozytosehemmenden Substanzen, Proteaseinhibitoren, M β CD oder Filipin III behandelt. Tabelle 15 fasst die verwendeten Inhibitoren und Substanzen zusammen.

Tabelle 15: Inhibitoren der Endozytose und andere Substanzen

Substanz	Konzentration
Lysosomotrope Substanzen	
Ammoniumchlorid	10-50 mM
Bafilomycin A1	20 – 100 nM
Concanamycin A	10-100 nM

Monensin	1-10 μ M
Endozytosehemmende Substanzen	
Chlorpromazin-HCl	10-15 μ M
Proteaseinhibitoren	
E-64	1-10 μ M
Leupeptin	1-10 μ g/ml
Cholesterolentzug/-Bindung	
Flipin III	1-15 μ g/ml
Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD)	5-15 mM

Die Virusinokulation erfolgt wie beschrieben in der Anwesenheit der Inhibitoren bei einer MOI von 1 PFU/Zelle oder mit Log-Virus-Verdünnungen. Die Auswertung der Titer erfolgt 20-24 h nach Inokulation (p.i.). Als Kontrollen dienen nicht-infizierte (MOCK) oder unbehandelte/infizierte (Kontrolle) Zellen. Die Lösungen werden entweder in DMSO (Endkonzentration $\leq 0.25\%$), 100% EtOH oder ddH₂O angesetzt. Um die Überlebensfähigkeit der Zellen in Anwesenheit der entsprechenden Substanzen (Tabelle 15) zu überprüfen werden die Zellen mit diesen inkubiert und nach 24-48 h mit 4',6-diamidino-2-phenylidole-dihydrochlorid (DAPI) gefärbt. DAPI kann in apoptotische Zellen eindringen und färbt die Zellkerne, wogegen eine Färbung der Zellkerne bei lebenden Zellen nicht möglich ist. Die Auswertung erfolgt mittels Epifluoreszenzmikroskopie. Für weitere Experimente werden die Zellen mit den lysosomotropen Substanzen Ammoniumchlorid oder Bafilomycin A1 inkubiert, die Viren gebunden und anschließend für 5 min/37°C einem pH-Puls (pH 5.0) ausgesetzt. Nach Neutralisierung wird wie beschrieben ein Plaqueassay durchgeführt.

C.11 Charakterisierung und Analyse der Fusion von Coronaviren

Zur Untersuchung der Fusionsaktivität des Coronavirus MHV-A59 wird der Fluoreszenzdequenching (FDQ)-Assay verwendet. 17Cl-1 Mausfibroblasten dienen als Zielzellen und werden mit fluoreszenzmarkierten Viren inkubiert. Der FDQ-Assay basiert auf der Umverteilung des lipidähnlichen Fluoreszenzmarker Octadecylrhodamin-B-chlorid (R₁₈) der nach Fusion von viraler und zellulärer Membran ein Dequenching zur Folge hat, das zu einem Fluoreszenzanstieg führt.

C.11.1 Herstellung von Erythrozytenghost

Die Präparation der Erythrozytenghost wird nach der Methode von Dodge et al. [192] durchgeführt. Das Erythrozytenkonzentrat wird dreimal mit PBS gewaschen (2,000 x g, 10 min, 4°C) und in eiskaltem Hämolysepuffer I (5.8 mM NaH₂ PO₄/Na₂HPO₄) resuspendiert. Nach Inkubation für 20 min bei 4°C wird die Suspension 20 min bei 20,400 x g, 4°C, zentrifugiert, das

Pellet in eiskaltem Hämolysepuffer I resuspendiert und für weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 20,400 x g und 4°C. Dieselbe Inkubation und anschließende Zentrifugation wird so oft wiederholt, bis die Erythrozytenghost farblos sind. Zum Schluss werden die Erythrozytenghost mit 70 ml kaltem PBS gewaschen (10 min, 20,400 x g, 4°C). Sie können nach Zusatz von 0.02% NaN₃ bis zu zwei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

C.11.2 Markierung der Viren

Für die Markierung von MHV-A59 mit R₁₈ unter selbstlöschenen Fluoreszenzbedingungen [193] werden 100 µl einer 2 mg/ml konzentrierten Viruslösung mit 0.5 µl einer 2.2 mM R₁₈-Lösung (in EtOH) versetzt, bei 700 rpm, RT für 30 Minuten im Dunkel schüttelnd inkubiert, wie bereits für die Markierung von Influenzaviren beschrieben [194]. Das nicht eingebaute R₁₈ wird nach Zentrifugation bei 55,000 x g und 4°C für 10 min entfernt. Nach einem Waschschriff mit PBS+ werden die markierten Viren in 100 µl eiskaltem PBS+ aufgenommen. Nahezu 90% der Fluoreszenz liegt „gequencht“ in der viralen Membran vor. Die Markierung der Viren hat keinen Einfluss auf die Infektivität, was durch den Plaqueassay bestätigt werden konnte.

C.11.3 Fusionsmessungen

Für den FDQ-Assay werden 17Cl-1 Zellen in T75-Zellkulturflaschen gezüchtet und geerntet (10⁷ Zellen/ml). Fluoreszenzmarkierte MHV-A59 werden in eiskaltem PBS+ bei einer Konzentration von 3-5 pfu/Zelle zu den Zellen gegeben und 40 min bei 4°C leicht schüttelnd (200-300 rpm) inkubiert. Um die nicht gebundenen Viren zu entfernen, wird die Virus-Zell-Suspension zweimal mit PBS+ bei 300 x g gewaschen, und das Pellet in 300 µl PBS+ resuspendiert. 150 µl der Virus-Zell-Suspension werden zu 1.85 ml Na-Acetat-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Na-Acetat Trihydrat, pH 7.4 und 37°C) in einer Quarzküvette gegeben, und die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 4°C und 37°C bei entweder pH 7.4 oder 5.0 verfolgt [193]. Die Fusion wird mit dem Spektrofluorimeter (Aminco-Bowman, Urbana, IL, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 560 nm, einer Emissionswellenlänge von 590 nm (cut-off Filter 570 nm, Zeitauflösung 1 sec) und einer Spaltbreite von 4 nm verfolgt. I_0 ist die Fluoreszenzintensität der gefärbten Viren gebunden an die Zielzellen zum Zeitpunkt t=0. Die zeitabhängige Fluoreszenzintensität $I(t)$ wird für 30 min bei den benannten pH-Werten verfolgt. Um ein vollständiges Dequenching zu erreichen und das Fluoreszenzmaximum zu bestimmen, werden 0.2% Triton X-100 zugegeben. Das Ausmaß der Fusion (F) ist proportional zum Fluoreszenzmaximum (%) und wird definiert als [195] Formel (2):

$$F = \frac{I(t) - I_0}{I_{\max} - I_0} \times 100\%$$

Für weitere Experimente werden die Viren bei pH 5.0 für 15 min bei 37°C inkubiert und nach Neutralisierung an die Zellen gebunden. Das Fluoreszenzdequenching wird wie beschrieben gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe von Sigma Plot 8.0 und 10.0 (SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, USA).

C.12 Mikroskopie

C.12.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Subkonfluente 17Cl-1 Zellen in 35 mm/14 mm² Glassbodenschälchen (MaTek, Ashlands, MA, USA) werden mit fluoreszenzmarkierten MHV-A59 bei einer MOI von 5 – 10 pfu/Zelle für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Für weitere Experimente erfolgt die Inkubation der Zellen mit lysosomotropen Reagenzien, Proteaseinhibitoren oder Cholesterol-entziehenden Substanzen (Tabelle 15). Um ungebundenes Virus zu entfernen werden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend werden die Virus-Zell-Komplexe bei pH-Werten von 5.0 und 7.0 für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ausbildung von Synzytien nach Infektion verschiedener Mauszelllinien mit MHV-A59 oder MHV-S4 wird 24 h p.i. mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. In zusätzlichen Experimenten werden die markierten Viren für 15 Minuten einem pH-Wert von 5.0 bei 37°C oder 4°C ausgesetzt, neutralisiert und das Fusionsverhalten bei pH 7.0 und 5.0 verfolgt. Alle Proben werden sofort über Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die Bildaufnahmen erfolgen in jedem Fall mit Hilfe der MetaView Software (Universal Imaging, Buckinghamshire, UK). Die primäre Bildbearbeitung und -auswertung wird mit Hilfe der MetaMorph Software (Universal Imaging, Buckinghamshire, GB) durchgeführt, gefolgt von der Bearbeitung mit Adobe® Photoshop® und Adobe® Illustrator® (Adobe Systems GmbH, München, Germany).

C.12.2 Konfokalmikroskopie

Zusätzlich zu den epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen werden mit Hilfe des FluoView™ FV-1000 Konfokalmikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) konfokalmikroskopische Analysen der Virus-Zell-Fusion durchgeführt. R₁₈-markierte MHV-A59 werden mit dem 543 nm Laser angeregt und die Emission wird bei BP 590-655 detektiert. Für die Aufnahmen wird ein Öl-Immersions-Objektiv mit einer 60x Vergrößerung und einer numerischen Apertur (NA) von 1.35 (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet. Alle Experimente werden, wenn nicht anders angemerkt bei 37°C durchgeführt. Die Auswertung der konfokalen Bilder erfolgt mittels der Olympus FluoView™ Software Version 1.4 a (Olympus, Hamburg, Deutschland).

C.13 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Fusion von SARS-CoV**C.13.1 Überprüfung der Oberflächenexpression des S-Proteins von SARS-CoV und des humanen Rezeptors hACE2**

Die Volllängenvarianten der Proteine SARS-CoV S und des humanen Rezeptors hACE2 werden in HEK293T-Zellen exprimiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) analysiert. Tabelle 16 fasst die für die IFM verwendeten Primär- und Sekundärantikörper zusammen:

Tabelle 16: Antikörper für die IFM

Epitop	Primärantikörper	Sekundärantikörper
S-Full	anti-S-Full #IMG-542 (IMGENEX Corp., San Diego, CA; USA)	anti-Kaninchen Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
ACE2-Full	anti-hACE2 #MAB933 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)	anti-Maus FITC (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA)

HEK293T-Zellen werden am Vortag in 30 mm/14mm² Glassbodenschälchen ausplattiert, am Folgetag mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert und mit VTF7.3 infiziert. Für die IFM werden die Zellen 2x mit PBS-BSA-Puffer gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper in PBS-BSA-Puffer (Tabelle 16) für mind. 2 Stunden inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-BSA wird der entsprechende fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Tabelle 16) hinzu gegeben und für weitere 2 Stunden im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Die anschließende Fluoreszenzmikroskopie erfolgt bei Raumtemperatur mit dem Mikroskop Axiovert 100 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung eines 40 x Objektivs (Apoplan, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland). Die eingesetzten Fluorophore werden mit folgenden Einstellungen detektiert: Alexa Fluor 594 – 510-560 nm BP-Anregungsfilter/590 nm LP-Emissionsfilter, FITC (Fluoresceinisothiocyanat) – 450-490 nm Anregungsfilter/520 nm LP-Emissionsfilter. Die Aufnahme der Bilder erfolgt mittels der angeschlossenen gekühlten CCD-Kamera und der MetaView Software (Universal Imaging, Buckinghamshire, UK). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder werden wie beschrieben prozessiert und ausgewertet.

C.13.2 Kultur der Zellen

Für den Fusionsassay werden die transfizierten Zellen (HEK293T und VeroE6) in T75-Zellkulturflaschen bei 37°C/5 % CO₂ in D10 kultiviert. Für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen werden die Zellen geerntet. Dazu wird die Zellschicht zweimal mit HANKs-Puffer gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit 2 ml 0.25% Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 10 ml D10 resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden 2x mit eiskaltem PBS+ gewaschen und in 1 ml PBS+ (10⁷ Zellen/ml) resuspendiert.

C.13.3 Markierung der Zellen

Für die Fusionsexperimente werden HEK293T-Zellen parallel mit der pCDNA3 S-Full (HEK293T-S) und dem pEYFP-N1-Plasmid (Tabelle 12) transfiziert und mit VTF7.3 infiziert. VeroE6 werden mit der pCDNA3 ACE2-Full (VeroE6-ACE2) transfiziert und ebenfalls mit VTF7.3 infiziert. Abgelöste VeroE6-Zellen (10^7 Zellen/ml) werden mit dem Membranmarker R₁₈ markiert: Unter vorsichtigem Schütteln werden 20 µl R₁₈ (2 mM in Ethanol) zu den Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln werden 10 ml eiskaltes DMEM mit 5 % FCS (D5) zugegeben und 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden 2x mit PBS+ gewaschen (5 min bei 4°C, 380 x g). Im weiteren Verlauf der Experimente werden HEK293T-S Zellen mit 50 µl des cytosolischen Markers Calcein-AM (1 mM in DMSO) markiert. Calcein-AM diffundiert durch die Membran lebender Zellen ins Cytosol und wird dort von zelleigenen unspezifischen Esterasen zu Calcein umgewandelt, indem das Acetoxymethyl abgespalten wird. Es liegt dann in grün fluoreszierender Form und geladen vor und kann nicht mehr aus den Zellen permeieren. VeroE6-ACE2 Zellen werden in Suspension entweder wie beschrieben mit 20 µl des Membranmarkers R₁₈ (2 mM in EtOH) oder mit 50 µl des cytosolischen Markers CMTMR ((5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino) Tetramethylrhodamin (1 mM in DMSO) markiert.

C.13.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Fusion

Die HEK293T-S Zellen (EYFP oder Calcein-AM, grün) werden mit den VeroE6-ACE2 Zellen (R₁₈ oder CMTMR, rot) inkubiert und unter gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert: Dazu werden je 500 µl VeroE6-ACE2 zu den HEK293T-S Zellen hinzugegeben und für mind. 60 min auf Eis inkubiert. Nicht gebundene Zellen werden nach mehrmaligem Waschen mit eiskaltem PBS+ entfernt. Die Zell-Zell-Fusion wurde anschließend unter verschiedenen Bedingungen analysiert. Tabelle 17 fasst die untersuchten Bedingungen zusammen:

Tabelle 17: Bedingungen der Zell-Zell-Fusion

pH-Wert	Marker	Trypsin-TPCK
(1)		
5.0	EYFP R18	+
		-
7.4	EYFP R18	+
		-
(2)		
5.0	Calcein AM R18	+
		-
	Calcein AM	+

7.4	R18	-
Kontrolle	nicht transfiziert	-
(3)		
5.0	Calcein-AM	-
7.4	CMTMR	-
Kontrolle	nicht transfiziert	-

Die Zell-Zell-Fusion wird durch die Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 37°C, durch Erniedrigung des pH-Werts oder durch Zugabe von Proteasen (Trypsin-TPCK (1 mg/ml)) induziert (Tabelle 17). Nach 15 min Inkubation im Brutschrank (37°C) werden die Zellen mikroskopisch analysiert. Dabei wird der Übergang der einzelnen Fluorophore von Zelle zu Zelle kontrolliert. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen werden bei Raumtemperatur am Mikroskop Axiovert 100 unter Verwendung eines 40x Öl-Immersion Objektivs mit einer NA von 1.35 durchgeführt. Die Fluorophore werden mit folgenden Einstellungen detektiert: Rhodamin – 510-560 nm BP-Anregungsfilter/590 nm LP-Emissionsfilter, Calcein-AM – 450-490 nm Anregungsfilter/520 nm LP-Emissionsfilter. Die Aufnahme der Bilder erfolgt wie beschrieben.

C.14 Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59

Für die Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59 wird zunächst die primäre Aminosäuresequenz des S-Proteins von MHV-A59 aus der Swiss-Prot Database entnommen und mit den Kriterien für Fusionspeptide abgeglichen (siehe Einleitung). Die anschließende Anfertigung der Hydrophobizitätsplots der Vollängenvariante sowie der S2-Untereinheit des S-Proteins von MHV-A59 mit Hilfe der Membrane-Protein-Explorer Software - MPex - [196] ermöglicht die Auffindung hydrophober Proteinbereiche. Die Erstellung der Hydrophobizitätsplots basiert auf der Hydrophobizitätsskala einzelner Aminosäurereste nach Wimley und White (WWIH-Skala) und sagt aus, welche Energiebarriere (ΔG (kcal/mol)) überwunden werden muss, um einen Aminosäurerest von der wässrigen Phase in die Lipidphase zu überführen [181]. Hydrophile Reste besitzen einen negativen ΔG -Wert, wogegen hydrophobe Reste einen positiven ΔG -Wert aufweisen. Die durchschnittlichen Hydrophobizitätswerte von 19 Aminosäureresten werden unter Nutzung der WWIH-Skala herangezogen, um die entsprechenden Hydrophobizitätsplots zu generieren. Nach Ermittlung geeigneter Fusionspeptidkandidaten wird deren individueller ΔG -Wert bestimmt. Nach Vergleich der Aminosäuresequenzen der Fusionspeptidkandidaten mit bereits bekannten Fusionspeptiden anderer viraler Fusionsproteine wird mit Hilfe spezieller Programme die Sekundärstruktur berechnet und analysiert.

D. Ergebnisse

D.1 Expression und Isolierung des S-Proteins von SARS-CoV und des humanen Rezeptors hACE2

Das S-Protein von SARS-CoV wird mittels eines optimierten Expressionssystems in HEK293T Zellen exprimiert. Zur Untersuchung der Wechselwirkung des SARS-CoV S-Proteins mit dem humanen Rezeptor hACE2 [156] wird ACE2 im selben Zelltyp exprimiert. Drei Varianten des viralen Fusionsproteins wurden exprimiert und analysiert: (1) zwei Volllängenvarianten (S-Full) und (2) eine verkürzte Variante ohne Transmembrandomäne (S-Ekto). Die S-Ekto-Variante wird in das Zellmedium sezerniert und anschließend über den C-terminalen (His)₆-Tag isoliert und aufgereinigt. Nach Dialyse beider Varianten wurden die Proteinkonzentrationen, die Reinheit und die Größe bestimmt. Der Rezeptor ACE2 wurde ebenfalls als Volllängen- (ACE-Full) oder verkürzte Variante (ACE2-Ekto) exprimiert. Die Isolierung erfolgte mittels Immunopräzipitation. Ziel der Aufreinigung war die Isolierung beider Proteine in hochreiner Form, um anschließend eine kryoelektronenmikroskopische 3D-Strukturanalyse durchzuführen.

D.1.1 Optimierung der Expressionsbedingungen

Zur Optimierung der Bedingungen für die Expression und Anreicherung der entsprechenden Proteine wurden zunächst verschiedene Transfektionsbedingungen und Zelltypen getestet.

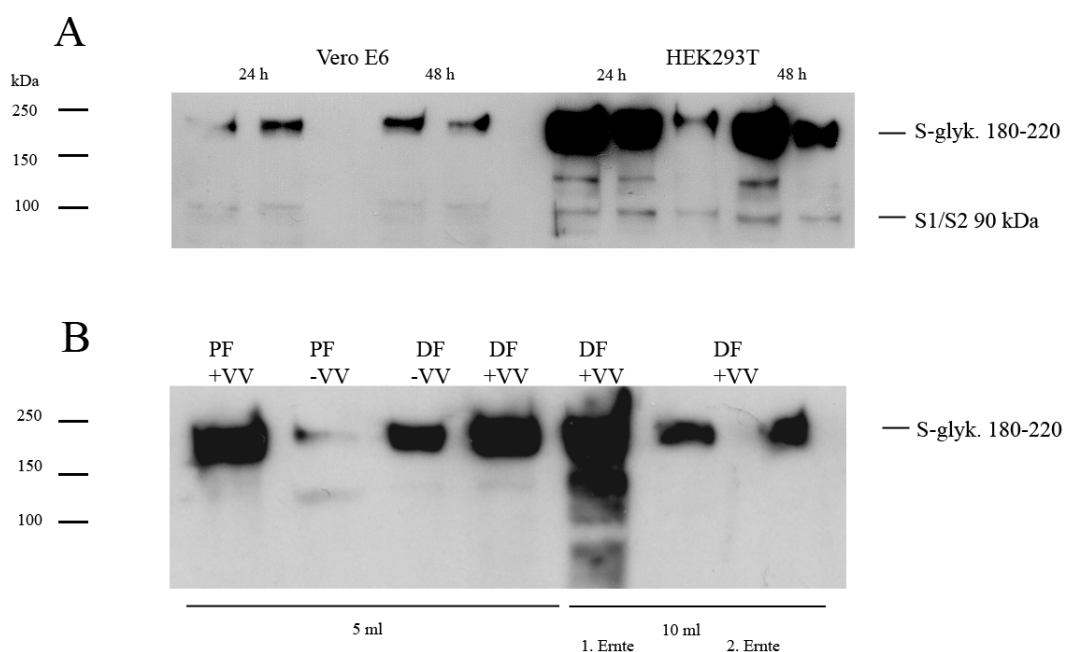


Abbildung 8: Optimierung der Transfektionsbedingungen für die Expression von S- und ACE2-Protein. (A und B) Vergleich der Transfektionsbedingungen von S-Ekto. Expression in zwei verschiedenen Zellsystemen mit verschiedenen Transfektionsreagenzien (PF und DF) und unterschiedlichen Infektionsbedingungen (+VV/-VV). Abkürzungen: VV-rekombinantes Vakziniavirus - VTF7.3; +VV-mit Infektion; -VV – ohne Infektion, PF – PolyFect; DF – DreamFect (siehe Material und Methoden und Text).

Um eine zu starke Cytotoxizität zu vermeiden wurden ferner verschiedene Verdünnungen des rekombinanten Vakziniavirus VTF7.3 (VV) getestet. VeroE6 und HEK293T Zellen unterschieden sich sehr deutlich im Expressionsmuster des S-Proteins von SARS-CoV. VeroE6 Zellen exprimierten eine relativ geringe Konzentration an S-Ektoprotein (Abbildung 8 A – Spuren 2,3,5 und 6). HEK293T Zellen dagegen zeigten eine deutlich höhere Ausbeute (Abbildung 8 A – Spuren 8, 9, 11 und 12). Die Inkubationszeit spielte für die jeweiligen Expressionsraten eine untergeordnete Rolle. Die Inkubation für 24 oder 48 h zeigte keine wesentlichen Unterschiede im Expressionsniveau. Als effektivste Transfektionsmethode für das S-Protein von SARS-CoV stellte sich die Transfektion mit DreamFect (DF) heraus (Abbildung 8 B – Spuren 3-7). Auch ohne Infektion der Zellen mit VTF7.3 konnten hohe Konzentrationen an Protein gewonnen werden. Nachhaltig verbessert wurde dieser Effekt durch den Einsatz des VTF7.3 Virus (Abbildung 8 B – Spur 5). Eine zweite Ernte war möglich und erlaubte eine, wenn auch geringere, Proteinausbeute (Abbildung 8 B – Spuren 6 und 7). Im Vergleich dazu war es unter Verwendung von PolyFect (PF) zwingend notwendig die Zellen mit VTF7.3 zu infizieren, da diese sonst lediglich eine geringe Proteinausbeute zeigten (Abbildung 8 B – Spur 2). Die Ausbeute nach der Infektion war vergleichbar mit der nach Transfektion mit DreamFect allein (Abbildung 8 B - Spur 1).

D.1.2 Expression und Aufreinigung des S-Proteins von SARS-CoV

Die Isolierung und Aufreinigung des S-Proteins erfolgte über den C-terminalen (His)₆-Tag. Die Ektodomäne des Proteins wurde in das Medium sezerniert, konzentriert und anschließend über NiNTA-Agarose aufgereinigt. Mittels eines Imidazolstufengradienten wurde das gebundene Protein eluiert (siehe Material und Methoden). Um das überschüssige Imidazol zu entfernen, wurden die Proteinproben anschließend dialysiert und erneut konzentriert. Dies war notwendig, da Imidazol bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen stören würde.

Das Elutionsprofil der Aufreinigung der His-getaggten Variante der Ektodomäne des S-Proteins wurde über Westernblot analysiert. Das Elutionsoptimum lag bei einer Konzentration von 300 mM Imidazol (Abbildung 9 A, E3). Um sicher zu stellen, dass das Protein vollständig eluiert vorliegt, wurde im weiteren Verlauf der Experimente bei einer Konzentration von 500 mM Imidazol eluiert. Im NiNTA Pellet konnte nachweislich kein Protein detektiert werden (Abbildung 9 A, NiNTA). Um das Imidazol zu entfernen, wurden die Proben anschließend für mehrere Stunden gegen Na-Acetat Puffer (pH 7.4) dialysiert und konzentriert. Proteinkonzentrationen von 2-3 mg/ml konnten nach Aufreinigung von mehreren 100 ml Medium erzielt werden. Die Monomere des S-Proteins wurden über ein reduzierendes Proteingel analysiert (Abbildung 9 B). Die obere Bande entspricht vermutlich der glykosylierten (glyk) Form des S-Proteins mit einem Molekulargewicht (MW) von ca. 200 kDa, wogegen die untere Bande mit einem MW von 180 kDa der nicht glykosylierten (nicht-glyk) Form entspricht (Abbildung 9 B).

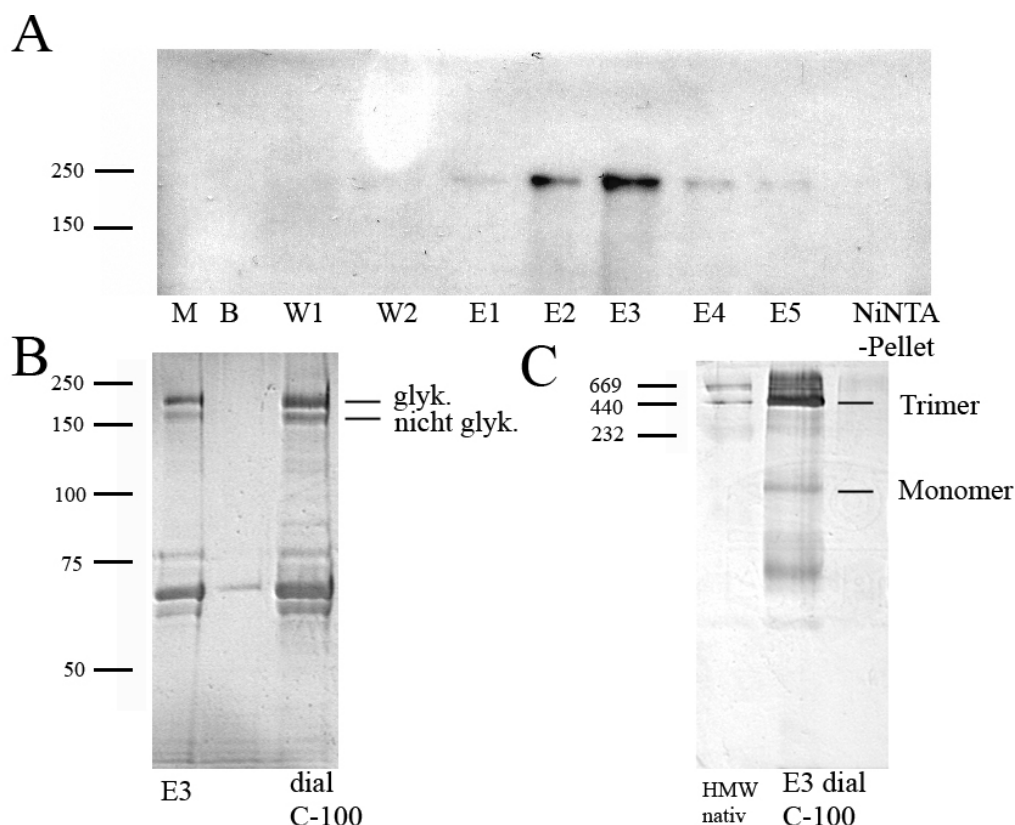


Abbildung 9: Proteinanalyse der S-Ektodomäne von SARS-CoV. (A) Westernblot des Elutionsprofils des exprimierten S-Proteins von SARS-CoV nach NiNTA-Aufreinigung. M–Marker, B–Bindungsfraction, W–Waschfraction, E–Eluatfraction, 1 - 5: 100–500 mM Imidazol. (B und C) SDS-PAGE: S-Proteinbanden unter reduzierenden (B) und nicht-reduzierenden (C) Bedingungen (siehe Material und Methoden, sowie Text). (C) Native Gelelektrophorese. HMW – High Molecular Weight Marker (Hochmolekulargewichtsmarker). Die Proteine im 10%igen Polyacrylamidgel wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

Zur Untersuchung des Oligomerisierungsgrades des S-Proteins wurde ferner ein nicht-reduzierendes/natives Gel angefertigt (Abbildung 9 C). Im Wesentlichen wurden zwei Oligomerisierungsgrade beobachtet. Die Mehrheit der S-Proteine bildeten Trimere mit einem Molekulargewicht von 500 kDa aus (Abbildung 9 C). Eine Bande mit einem etwas höheren Molekulargewicht von ca. 660 kDa entspricht womöglich höheren Oligomerisierungsformen (Tetramere). Ferner finden sich eine schwache Monomerbande und Proteinbanden mit einem niedrigeren Molekulargewicht, möglicherweise Abbauprodukte des viralen Proteins. Eine Dimerisierung des S-Proteins konnte nicht beobachtet werden.

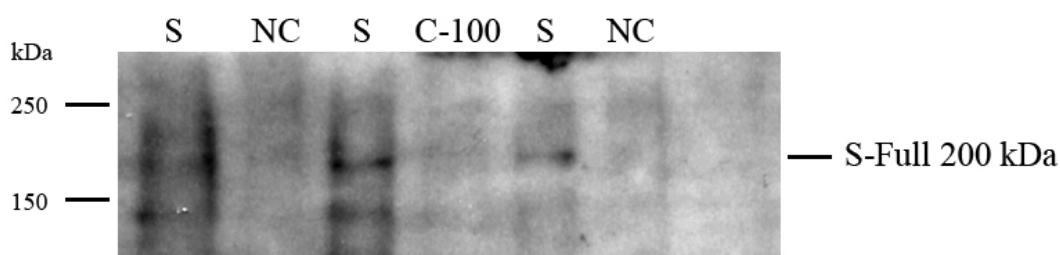


Abbildung 10: Expression der Volllängenvariante des S-Proteins von SARS-CoV. Nach Lyse der transfizierten Zellen wurden die Proteine zunächst über eine SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend über Westernblot und nachfolgender Detektion mit dem polyklonalen anti-S-Full #IMG542 Antikörper analysiert (Details in Material und Methoden). NC - Negativkontrolle, S - Spike, C-100 – Centricon-100

Die Expression der Volllängenvariante des S-Proteins von SARS-CoV erfolgte in HEK293T-Zellen und wurde nach Solubilisierung der Zellmembranen mit einem detergenzhaltigen Puffer isoliert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Auftrennung über eine reduzierende SDS-PAGE und den anschließenden Westernblot. Die Proteinausbeute war bei keiner der gezeigten Fraktionen zufrieden stellend und auch nach Konzentrierung der Proteine konnte keine Anreicherung festgestellt werden (Abbildung 10 Spur 4). Der polyklonale Antikörper #IMG-542 zeigte nicht die gewünschte Spezifität (Abbildung 10 Spuren 1, 3 und 5). Zum einen lag dies an der deutlich höheren Zahl an Fremdproteinen im gewonnenen Gesamtzelllysate, welche auch nach der differentiellen Dichtezentrifugation nicht reduziert werden konnte. Eine hochreine Aufreinigung des Proteins wie im Fall der S-Ekto Variante war mit diesem Konstrukt und der angewandten Methode nicht möglich.

D.1.3 Klonierung und Expression der Volllängenvariante des S-Proteins von SARS-CoV mit myc-(His)₆-Tag

Nach erfolgreicher Aufreinigung der sezernierten Variante des S-Proteins von SARS-CoV wurde die Volllängenvariante des Proteins (S-Full) mit einem myc-(His)₆-Tag kloniert und exprimiert. Für die Klonierung wurde der vorhandene Vektor pcDNA3-S-Full verwendet. Als Zielvektor wurde die pcDNA3.1 myc/His A mit einem C-terminalen myc und (His)₆-Epitop verwendet. Der die Sequenz für das S-Protein beinhaltende Donor-Vektor pcDNA3-S-Full wurde einem Restriktionsverdau mit BamHI und XbaI unterzogen, um die entsprechende DNA-Sequenz (Insert) für das S-Full Protein zu erhalten (Abbildung 11 A – Spur 3). Der Akzeptor-Vektor pcDNA3.1 myc/His A wurde ebenfalls verdaut und so linearisiert (Abbildung 11 A – Spur 2). Anschließend wurde die S-Full Sequenz (Insert) über die Restriktionsseiten BamHI und XbaI („sticky ends“ = überhängende Enden) in den Vektor kloniert. Zur Überprüfung der Ligation wurde die Transformation in kompetenten CMK603 Bakterien durchgeführt, diese wurden ausplattiert und sieben positive Klone analysiert. Eine positiver Klon (#7) wurde amplifiziert und nach Verdau mit den verwendeten Restriktionsenzymen BamHI und XbaI über ein Agarosegel analysiert. Die resultierenden Banden (Vektor und Insert) wiesen das erwartete Molekulargewicht von 5.5 kb pcDNA 3.1/myc-His A Vektor und 3.9 kb das S-Full Insert mit einer Gesamtgröße von ~10 kb auf (Abbildung 11 B - Spur 2). Als Vergleich wurde der unverdaute Vektor analysiert (Abbildung 11 B – Spur 1).

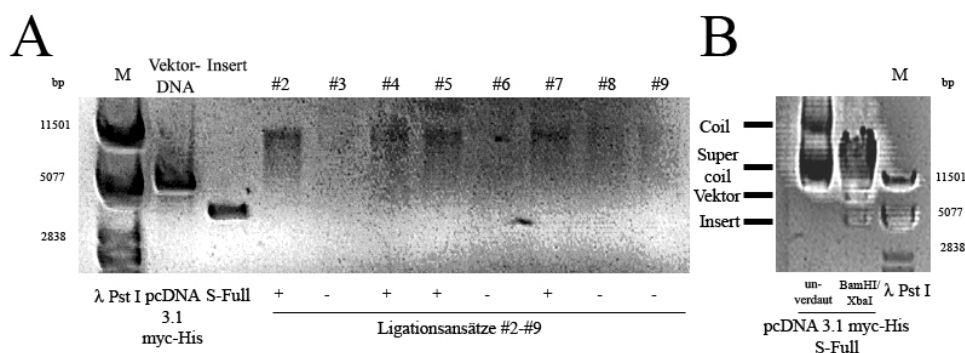


Abbildung 11: Klonierung der Vollängenvariante des S-Proteins von SARS-CoV mit myc-His-Tag. (A) Verdau des pcDNA3.1/myc-His A Vektors mit BamHI und XbaI (Spur 2, Größe ~5.5 kb). Verdau der S-Full beinhaltenden pcDNA3.1 mit BamHI und XbaI (Spur 3, ~3.9 kb) und die anschließende Überprüfung der Ligationsansätze #2-#9. (B) Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde nach Amplifikation der pcDNA3.1 myc-His S-Full (Maxipräparation, siehe Material und Methoden) die DNA mit BamHI und XbaI verdaut (Spur 2). Zum Vergleich wurde das unverdaute Plasmid aufgetragen (Spur 1).

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung und Expression der myc-His-getaggten Vollängenvariante des S-Proteins wurden HEK293T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der pcDNA3.1/myc-His-A-S-Full transfiziert, mit VTF7.3 infiziert und das Proteinexpressionsprofil über Westernblot analysiert (siehe Material und Methoden).

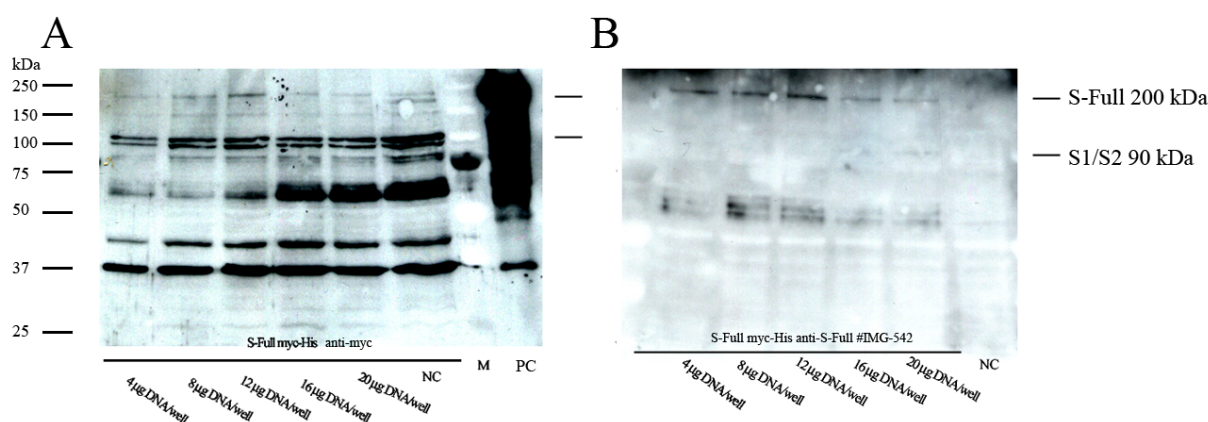


Abbildung 12: Expression der Vollängenvariante des S-Proteins von SARS-CoV mit myc-His-Tag. Inkubation der Westernblots mit dem anti-myc Antikörper (A) und dem anti-S-Full #IMG-542 Antikörper (B) (siehe Material und Methoden). NC – Negativkontrolle; PC – Positivkontrolle.

Nach Expression der klonierten S-Proteinvariante wurden die Zellen mit einem detergentzhaltigen Solubilisierungspuffer aufgebrochen und einer differentiellen Dichtezentrifugation unterzogen. Als Kontrollen wurden nicht-transfizierte Zellen (NC) und als Positivkontrolle (PC) für den myc-Tag aufgereinigtes S-Ekto Protein mitgeführt. Die Analyse erfolgte sowohl mit dem monoklonalen Antikörper gegen das myc-Epitop (Abbildung 12 A), als auch mit dem polyklonalen Antikörper #IMG-542 gegen ein Epitop auf dem S-Protein von SARS-CoV. Die besten Proteinausbeuten wurden bei einer Konzentration von 12 µg DNA/well erzielt. Die Bande des S-Proteins lief bei

einem Molekulargewicht von 200 kDa (Abbildung 12 A und B, jeweils Spur 3). Im Bereich eines Molekulargewichts von 100 kDa ließen sich zwei weitere Banden detektieren, die vermutlich den Untereinheiten S1 und S2 mit einem Molekulargewicht von je 90 kDa entsprachen (Abbildung 12 A). Auch die untransfizierte Kontrolle (NC) zeigte in diesem Bereich ein ähnliches Signal (Abbildung 12 A, Spur 6). Vermutlich reagierte der entsprechende Antikörper in diesem Bereich unspezifisch. Im Bereich der S-Protein Bande wurde bei keiner der Negativkontrollen ein Signal detektiert (Abbildung 12 A und B, jeweils Spur 6). Die Positivkontrolle (PC) dagegen zeigte im erwarteten Molekulargewichtsbereich ein sehr deutliches Signal (Abbildung 12 A, Spur 8).

D.1.4 Expression verschiedener Varianten des ACE2-Rezeptorproteins

VeroE6 Zellen exprimieren den Rezeptor ACE2, der kürzlich als Rezeptor für SARS-CoV identifiziert wurde [156], endogen. Im Experiment wurde das Expressionsniveau von ACE2-Full in VeroE6 Zellen (untransfiziert) und HEK293T Zellen (transfiziert) verglichen. Die verkürzte Variante ACE2-Ekto wurde außerdem in HEK293T Zellen exprimiert. Für die Analyse der Vollängenvarianten mussten die Zellen solubilisiert und die verschiedenen zellulären Membranen wie beschrieben getrennt werden.

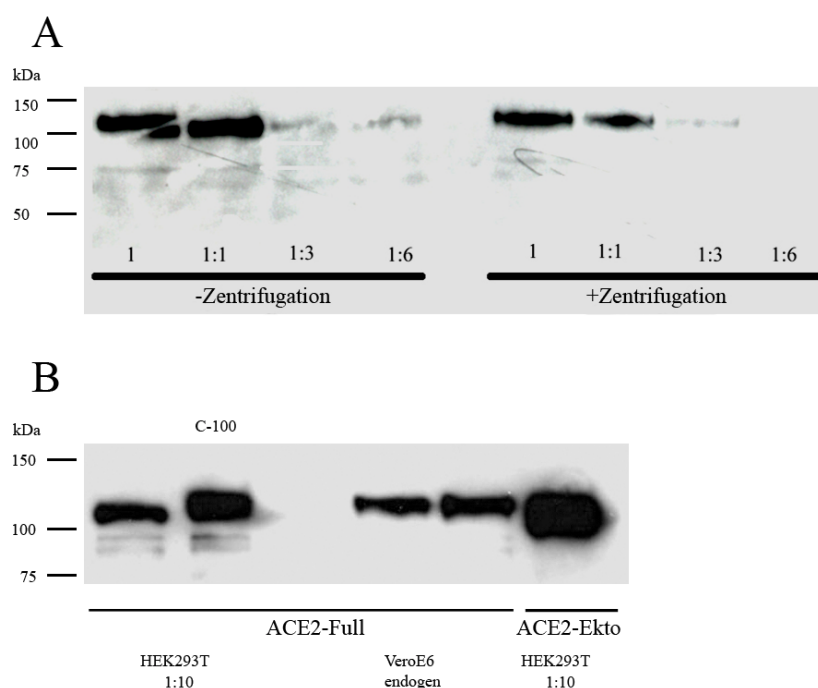


Abbildung 13: Nachweis des ACE2-Rezeptors in VeroE6 Zellen und Expression von ACE2 in HEK293T-Zellen. (A) VeroE6 Zellen exprimieren den ACE2-Rezeptor endogen. Mit einem detergentenhaltigen Solubilisierungspuffer inkubierte Zellen wurden nach differentieller Dichtezentrifugation mittels Westernblot und nach Inkubation mit einem gegen ACE2 gerichteten monoklonalen Antikörper analysiert (siehe Material und Methoden). Die entsprechende Proteinbande wurde im Bereich von 110 kDa detektiert. (B) Expression der ACE2-Varianten in HEK293T Zellen. Verdünnungsfaktor 10 bei transfizierten HEK293T-Zellen.

Abbildung 13 A zeigt das endogene Expressionsniveau von ACE2-Full in verschiedenen Verdünnungen, mit und ohne Zentrifugation. Vergleicht man die endogenen Expressionsraten von VeroE6 Zellen mit denen transfizierter HEK293T Zellen so lässt sich ein deutlicher Unterschied feststellen. Die Ausbeute der verschiedenen Proteinvarianten lag in transfizierten HEK293T Zellen deutlich höher (Verdünnungsfaktor 10) als bei den endogen exprimierenden VeroE6 Zellen (Abbildung 13 B). Die in HEK293T-Zellen exprimierte verkürzte ACE2-Ektodomäne (ACE2-Ekto) wurde ins Zellmedium sezerniert (Vgl. S-Ekto) und konnte in hoher Ausbeute angereichert werden (Abbildung 13 B – Spur 6, beachte Verdünnung 1:10).

D.2 Isolierung und Aufreinigung von MHV-A59

Die Isolierung der Viren sowie des S-Proteins von MHV-A59 erfolgte nach der von Sturman et al. [197] beschriebenen Methode. Intakte MHV-A59 wurden in 17Cl-1 Zellen vermehrt, isoliert, aufgereinigt und konzentriert (siehe Material und Methoden). Das S-Protein wurde anschließend aus der Detergenzextraktion von MHV-A59 aufgereinigt. Das Detergenzextrakt von nativen Coronaviren enthält die membranständigen Glykoproteine S, E und M. Im Vergleich zu den Coronaviren der anderen Untergruppen exprimiert MHV-A59 keine Hämagglutininesterase (HE). Das S-Protein mit einer Größe von 180-250 kDa läuft im Vergleich zu SARS-CoV für MHV-A59 als eine Bande. Es liegt in nicht-reduzierenden nativen Proteingelen als Trimer vor (nicht gezeigt).

Tabelle 18: Physikalische Eigenschaften von Coronaviren

Virusfamilie	Coronaviridae
Virion Mr ($\times 10^6$)	400
Struktur	pleomorph
Größe	120-160
S20W	300-500
Saccharose Schwimmdichte (g/cm^3 (ml))	1.15-1.19
CsCl₂ Schwimmdichte (g/cm^3 (ml))	1.23-1.24
Zusammensetzung	Lipide, Kohlenhydrate, RNA
Empfindlichkeit	Hitze, organische Lösungsmittel, Detergenzien

Das Molekulargewicht der Coronaviren beträgt durchschnittlich $\sim 400 \times 10^6$ Da, dies entspricht 400 MDa. Die Viren haben eine pleomorphe Struktur. Die Schwimmdichte der Coronaviren liegt bei $1.23\text{-}1.24 \text{ g/cm}^3$ in einem CsCl-Gradienten und bei $1.15\text{-}1.19 \text{ g/cm}^3$ in einem Saccharosedichtegradienten. Der Sedimentationskoeffizient liegt bei 300-500 S. Unter *in vitro* Bedingungen sind einige Viren stabil und halten sogar Umgebungen mit pH-Werten von bis zu drei stand. In Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen sind die Virionen ebenfalls stabil. Ferner sind Coronaviren hitzeempfindlich, empfindlich gegen lipidlösliche Substanzen, nicht-ionische Detergenzien,

Formaldehyd und oxidierende Substanzen. Die allgemeinen physikalischen Eigenschaften der Coronaviren wurden in Tabelle 18 zusammengefasst.

Zur Vermehrung von MHV-A59 in 17Cl-1 Mausfibroblastenzellen wurden die Zellen infiziert, und das virushaltige Medium 46–48 h p.i. geerntet. Nach Zentrifugation der Zellreste (P) wurden die im Überstand befindlichen Viren präzipitiert und zentrifugiert (PEG-Präzipitat, siehe Material und Methoden). Das virushaltige PEG-Pellet wurde zunächst in BisTris-Puffer (pH 6.5) aufgenommen und über einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten geschichtet. Nach Ultrazentrifugation war an der Phasengrenze beider Saccharoselösungen eine deutliche Virusbande sichtbar. Diese wurde in BisTris-Puffer aufgenommen und dialysiert, um die Saccharose zu entfernen.

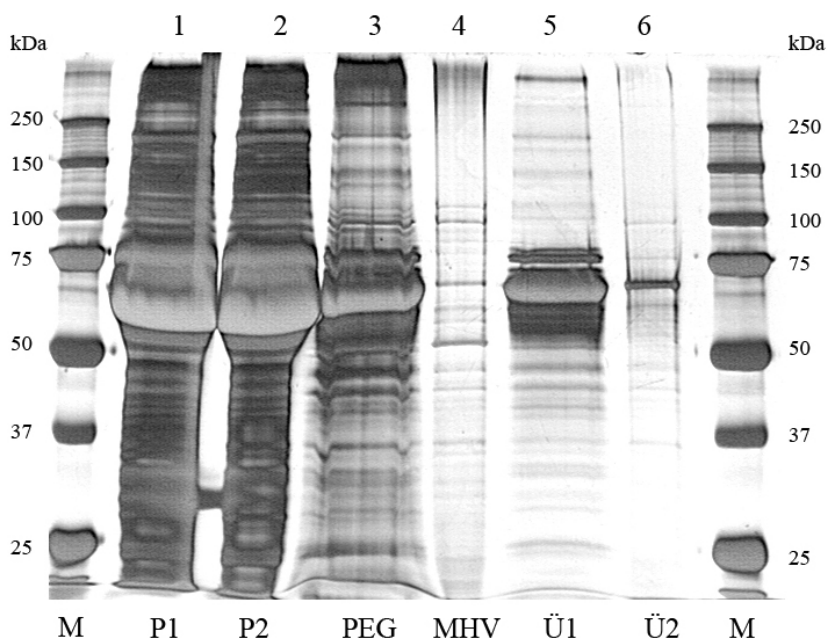


Abbildung 14: Isolierung und Charakterisierung von MHV-A59. SDS-PAGE (10%), Silberfärbung einer MHV-A59 Virusaufreinigung. Die Virusüberstände P1 und P2 48 h p.i. zeigen zahlreiche Proteinbanden. Das PEG-Präzipitat weist deutlich weniger und schwächere Proteinbanden auf. MHV-A59 Virusaufreinigung über einen diskontinuierlichen Saccharosestufengradienten mit 30 und 50% Saccharose 16 h nach Ultrazentrifugation bei 110,000 x g. Die Virusbande ist nach Zentrifugation an der Phasengrenze zwischen 30 und 50% Saccharose als weißlich, milchig zu erkennen. Das am stärksten exprimierte N-Protein ist in hoher Konzentration vertreten (MHV-Bande bei 45-55 kDa). Ü1 (höchstens 30% Saccharose) und Ü2 (höchstens 50% Saccharose).

Das Proteinprofil der einzelnen Fraktionen ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Überstände P1 und P2 enthalten zahlreiche nicht-virale Proteine, die vor allem aus dem eingesetzten Medium stammen (Abbildung 14, Spuren 1-2). Die viralen Titer dieser Fraktionen liegen bei $1-2 \times 10^7$ pfu/ml (Tabelle 19). Nach Präzipitation der Viren nimmt die Zahl der Proteine deutlich ab und der virale Titer um Faktor 10 auf 2.48×10^8 pfu/ml zu (Abbildung 14, Spur 3 und Tabelle 19). Nach Untersuchung der MHV-Virusbande war festzustellen, dass ausschließlich virale Strukturproteine

enthalten sind und der virale Titer erneut um das über 2fache auf 6.04×10^8 ansteigt (Abbildung 14, Spur 4 und Tabelle 19 - MHV). Die Überstände Ü1 (Saccharose < 30%) und Ü2 (Saccharose > 50%) enthalten ebenfalls hohe Konzentrationen an Viruspartikeln. Die Titer betragen 2.6×10^8 pfu/ml (Ü1) und 4.6×10^8 pfu/ml (Ü2) (Tabelle 19). Nicht-virale Proteinbestandteile, wie BSA, sammeln sich aufgrund ihres Molekulargewichts vorwiegend in Überstand Ü1 an (Abbildung 14, Spur 5).

Tabelle 19: Titerbestimmung der einzelnen Fraktionen nach der Virusaufreinigung

Probe	Volumina (ml)	PFU Ø	Titer (pfu/ml)
P1	26	5	1×10^7
P2	166	9	1.8×10^7
PEG - Präzipitat	7	124	2.48×10^8
Ü1	7	13	2.6×10^8
MHV	2.2	302	6.04×10^8
Ü2	3	23	4.6×10^8

Zur Isolierung des S-Proteins von MHV-A59 wurden die Virionen zunächst mit detergenzhaltigem Lysepuffer (NP-40-Lysepuffer) solubilisiert. Mit Hilfe eines kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (15-50% Saccharose), der 0.1% NP-40 enthielt, konnten die einzelnen Proteinbestandteile nach Ultrazentrifugation getrennt werden (siehe Material und Methoden). Die anschließende Fraktionierung ergab folgendes Proteinprofil (Abbildung 15):

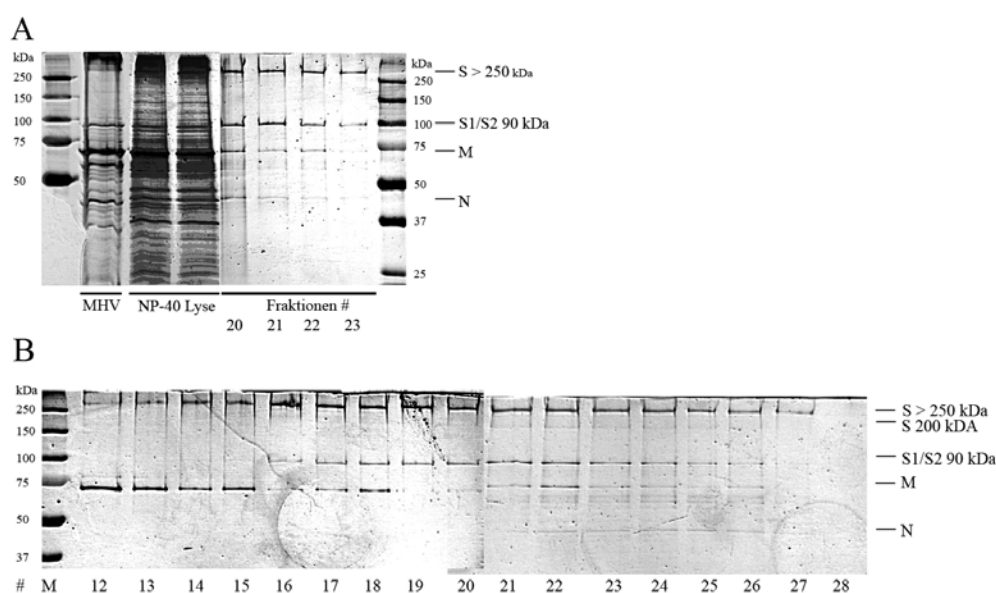


Abbildung 15: Isolierung des S-Proteins aus intakten MHV-A59. (A) Isolierung von MHV-A59 (Spur 1), Lyse der isolierten Viren mit NP-40-Lysepuffer (Spur 2 und 3). Fraktionen 20-23 eines kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten von MHV-A59 mit den einzelnen Strukturproteinen S, M und N (Spuren 4-7) (siehe Material und Methoden sowie Text). (B) Fraktionen 12-28 eines kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten lysierter Virionen. Die einzelnen Strukturproteine von MHV-A59 mit den jeweiligen Molekulargewichten sind rechts aufgeführt. 10%ige SDS-PAGE, Silberfärbung. S - Spikeprotein, M – Matrixprotein, N – Nukleokapsidprotein.

Die Strukturproteine M, N und S von MHV-A59 konnten aus aufgereinigten Viren isoliert werden. In den Fraktionen 20-23 fand sich die reinste Ausbeute an S-Protein (Abbildung 15 B). In fast jeder Fraktion wurden M-Proteinaggregate gefunden (Abbildung 15 A und B). Lediglich in Fraktion 23 (Abbildung 15 A) konnte eine reine S-Protein Fraktion mit der Vollängenvariante S > 250 kDa und einer gespaltenen Variante S1/S2 mit einem Molekulargewicht von 90 kDa isoliert werden. Die Fraktionen mit dem höchsten und reinsten Proteingrad an S-Protein wurden gepoolt, dialysiert und für weitere Experimente verwendet.

D.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen des S-Proteins von Coronaviren

D.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen des S-Proteins von SARS-CoV

Das S-Protein von SARS-CoV wurden in zwei Varianten exprimiert und aufgereinigt (siehe Ergebnisse, Material und Methoden). Beide S-Proteinvarianten zeigten eine Tendenz zur Aggregatbildung (Abbildung 16 A) und somit gestaltete sich die Identifizierung von Einzelmolekülen schwierig. Damit war auch ein Vergleich mit den publizierten S-Proteinstrukturen von SARS (Beniac et al., 2006) und den Kristallstrukturen der „Coiled-Coil“-Struktur (aus HR1 und HR2-Sequenzen) von SARS-CoV und MHV nicht möglich [159, , 163, , 165] . Lediglich einige nicht aggregierte Partikel entsprachen in ihren Abmessungen (ca. 160 Å) der für das S-Protein erwarteten Größe (Abbildung 16 B und Vergrößerung in B-1).

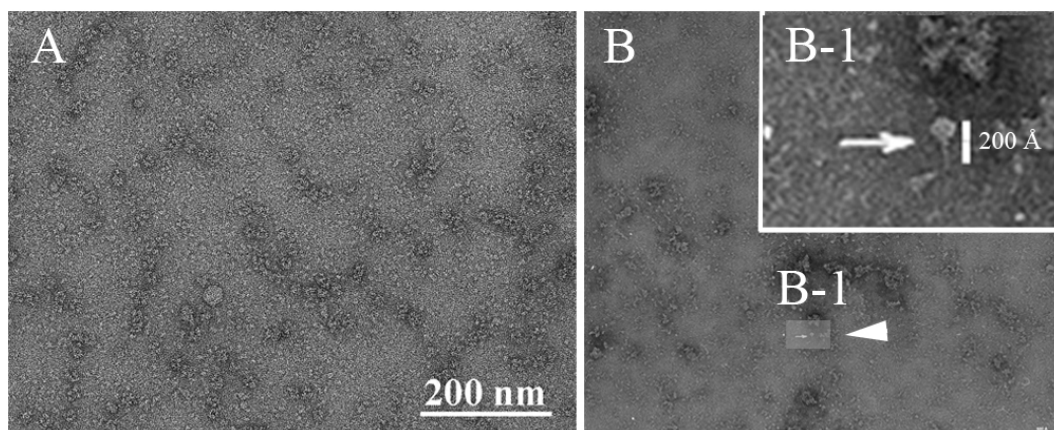


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Analyse des S-Proteins von SARS-CoV. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme aufgereinigter S-Proteinpartikel (S-Ekto). (B) S-Proteine (S-Full) mit Transmembrandomäne bilden Proteinaggregate. (B-1) S-Protein in Vergrößerung. Balken: 200 nm (A) und 200 Å (B-1).

Zur Vermeidung der Aggregatbildung wurden Ni-lipidhaltige Liposomen (SUVs) hergestellt. Das S-Protein, welches einen C-terminalen (His)₆-Tag besitzt, sollte an die in den Liposomen enthaltenen Ni-haltigen Kopfgruppen der Lipide binden und sich ausgehend vom C-Terminus auf der Oberfläche der SUVs orientieren und verschiedene Ausrichtungswinkel einnehmen. Dies hätte

gleichzeitig den Vorteil, dass für eine spätere 3D-Rekonstruktion eine Vielfalt von Ansichten mit verschiedenen Raumwinkeln zur Verfügung stehen würde.

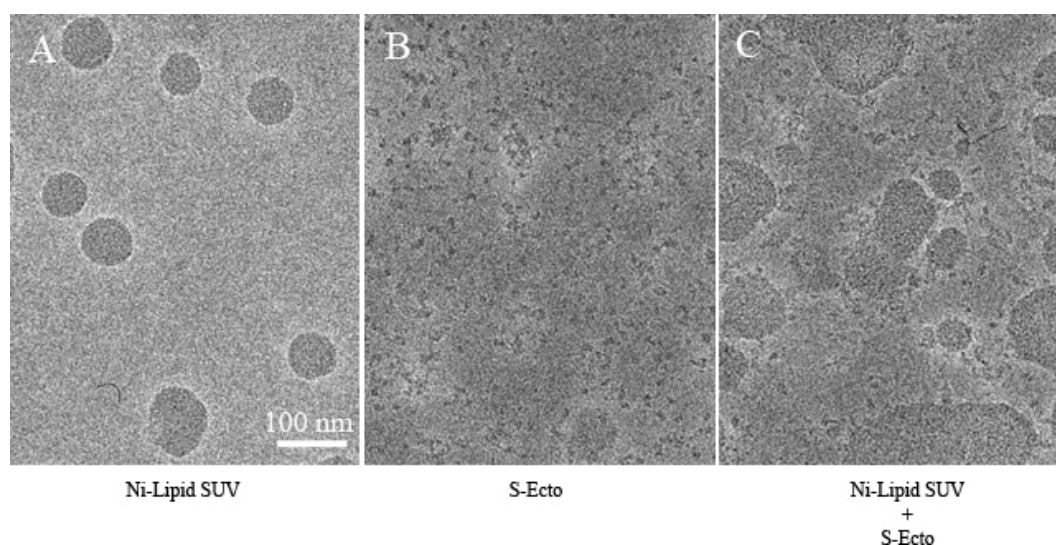


Abbildung 17: Die Ausrichtung des S-Proteins von SARS-CoV an Ni-lipidhaltigen SUVs. Die exprimierte S-Proteinvariante – S-Ekto besitzt am C-Terminus einen (His)₆-Tag, der mit Ni-Ionen chelatiert. Ni-lipidhaltige Liposomen sollten den C-Terminus des S-Proteins binden und somit orientiert werden. (A) Ni-lipidhaltige Liposomen (SUV). (B) Aufgereinigtes S-Protein (S-Ekto) in Lösung. (C) Ni-lipidhaltige SUVs im Gemisch mit der Ektodomäne des S-Proteins. Balken: 100 nm.

Die Ni-lipidhaltigen Liposomen weisen eine Größe ca. 100 nm im Durchmesser auf (Abbildung 17 A). Eine Lösung des S-Proteins (Abbildung 17 B) wurde mit den Ni-haltigen SUVs inkubiert (Abbildung 17 C). Eine Ausrichtung der Proteine an den Liposomen konnte nicht beobachtet werden, allerdings wiesen die Vesikel nach Inkubation mit dem viralen Fusionsprotein sowohl einen größeren Durchmesser als auch eine Veränderung in ihrer Form auf. Die anfänglich runde, gleichmäßige Form wurde zunehmend unregelmäßiger (Abbildung 17 C). Es konnte nicht festgestellt werden, ob die beobachteten Veränderungen der Liposomen auf die Zugabe der S-Proteine zurückzuführen war und welchen Einfluss das Vorhandensein des viralen Fusionsproteins auf deren Gestalt hatte.

D.3.2 Elektronenmikroskopische Analyse des S-Proteins von MHV-A59

D.3.2.1 Charakterisierung der Konformationsänderung des S-Proteins von MHV-A59

Unbehandelte Viren zeigen pleomorphe oder sphärische Gestalt und weisen einen Durchmesser von 80 – 200 nm (mehrheitlich 120 nm) auf. Die wohl definierten S-Proteine mit einer Länge von ungefähr 20 nm zeigen die Form eines elongierten Dreiecks mit der breiten Seite distal zur viralen Membran (Abbildung 18 A, S1). Die proximale Spitze des Dreiecks ist über eine dünne, flexible

Verbindung in der viralen Membran verankert (Abbildung 18 A, S2). Diese Beobachtung ist konsistent mit der bereits von Sturman et al. [197] publizierten.

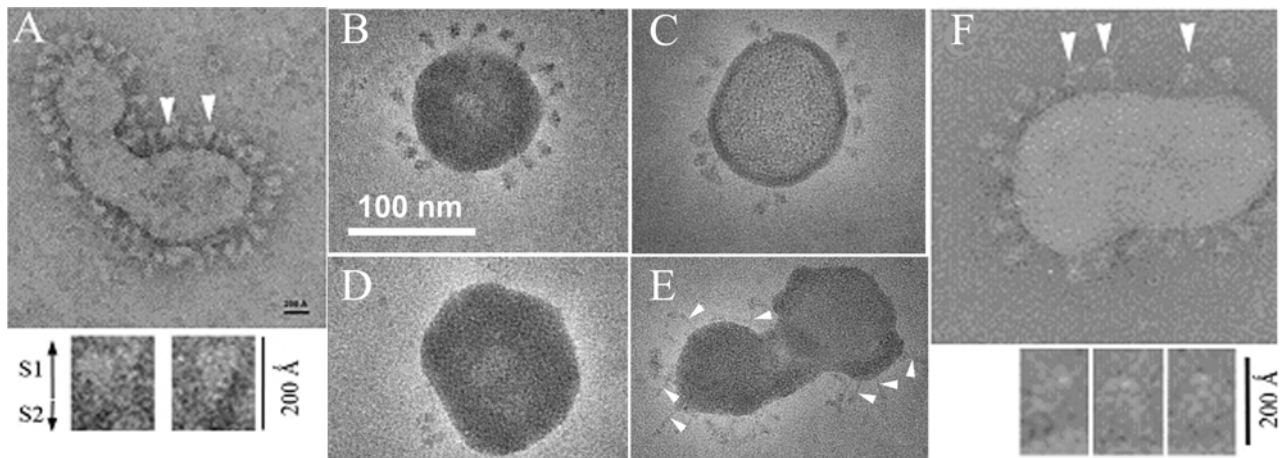


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Untersuchung von MHV-A59. (A) Bei neutralem pH (7.4) und RT inkubierte MHV-A59 Partikel. Zur detaillierten Betrachtung wurden zwei S-Proteine (Pfeile) ausgewählt und entsprechend vergrößert. (B-E) Inkubation bei saurem pH (5.0) und 37°C. (F) Inkubation bei neutralem pH (7.4) und 37°C. Balken: 200 Å, 100 nm. (Details siehe Material und Methoden und Text)

Nach Inkubation der Viren bei niedrigem pH-Wert (5.0) und 37°C werden deutliche strukturelle Veränderungen der S-Proteine sichtbar. Diese entsprechen vermutlich den verschiedenen Stadien der Konformationsänderungen. Einige Viren weisen noch immer S-Proteine auf, jedoch in deutlich geringerer Dichte (Abbildung 18 B-C). Die strukturellen Veränderungen können jedoch nicht eindeutig charakterisiert werden. Zahlreiche Virionen zeigen keine S-Proteine mehr (Abbildung 18 D) oder weisen lange, dünne, elongierte Spikes auf, denen die Kopfregion fehlt (Abbildung 18 E). In Kontrollversuchen mit Virionen, die bei neutralem pH-Wert und 37°C inkubiert wurden, konnten keine Konformationsänderungen im S-Protein beobachtet werden (Abbildung 18 F). Diese Beobachtungen legen nahe, dass eine Konformationsänderung im viralen S-Protein von MHV-A59 direkt durch einen niedrigen pH-Wert induziert werden kann.

D.3.2.2 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59

Aus den elektronenmikroskopisch digitalisierten Negativen, die mit einer Primärvergrößerung von 50.000 x unter Low-Dose-Bedingungen mikroskopiert wurden und nach Digitalisierung mittels Heidelberg Primescan Trommelscanner eine Auflösung von 1,56 Å/Pixel besitzen (siehe Material und Methoden), wurden interaktiv zunächst 2.800 brauchbare Einzelpartikel selektiert.

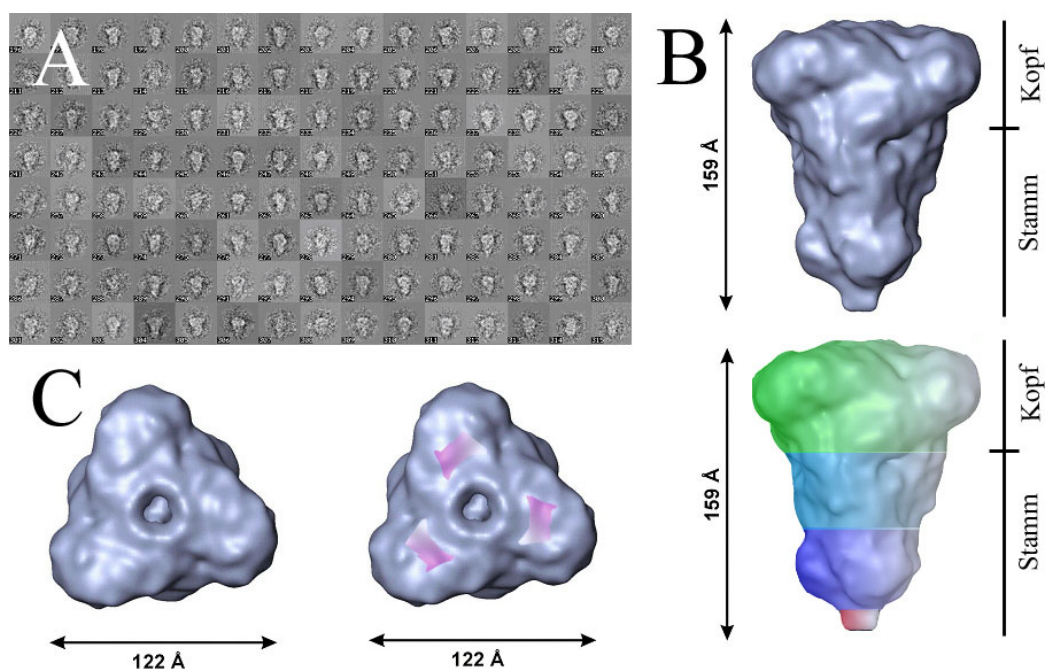


Abbildung 19: 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59. (A) Auswahl der Klassensummenbilder nach Einzelpartikelmethode (siehe Material und Methoden, Text). (B) Isosurface-Darstellung der 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59 in Seitenansicht (Side-View). (C) Isosurface-Darstellung der 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59 als „Top“-View. Mögliche Rezeptorbindungsstellen sind pink gekennzeichnet.

Die Bildverarbeitung nach der Einzelpartikelmethode wurde mit der Software IMAGIC-5 durchgeführt und lieferte als Ergebnis von multivariater statistischer Analyse und Klassifizierung typische Projektionen des S-Proteins als Klassensummen (Abbildung 19 A). Diese weisen eine deutlich verbessertes „Signal-zu-Rausch-Verhältnis“ auf. Die Eigenschaften und Dimensionen des S-Proteins konnten mit dieser Methode sehr gut eingeschätzt werden: Die Grundform erinnert an einen invertierten Kreiskegel mit einer möglichen Gliederung in Stamm- und Kopfregion bei einer Länge von 160 Å und einem maximalen Durchmesser von 120 Å (Abbildung 19 B und C). Die Anfertigung einer vorläufigen 3D-Rekonstruktion untermauert die in den Klassensummen gewonnenen Erkenntnisse. Der dünnen Verbindung proximal zur viralen Membran (rot) folgt eine erste dichtere Zone mit einem Durchmesser von 67 Å (dunkelblau) (Abbildung 19 B). Der Stamm setzt sich bis zu einer Höhe von 90 Å fort (dunkelblau + hellblau) (Abbildung 19 B). Es schließt sich die deutlich breitere Kopfregion mit einem Durchmesser bis zu 122 Å an (grün) (Abbildung 19 B). Die Ansicht von oben bestätigt die Trimerform und dreifache Symmetrie des S-Proteins. Drei exponierte „Flügel“ dominieren die Kopfdomäne und sind vermutlich für die Rezeptorbindung verantwortlich (Abbildung 19 C). Die mutmaßlichen Rezeptorbindungsstellen sind farblich gekennzeichnet.

D.4 Identifizierung des Infektionsweges von MHV-A59

D.4.1 Die Infektivität von MHV-A59 kann durch lysosomotrope Substanzen und Inhibitoren der Endozytose gehemmt werden

Um zu ermitteln, ob MHV-A59 die Zelle über den endozytotischen, Clathrin-abhängigen Weg infiziert und die Infektion das saure Milieu später Endosomen benötigt, wurde dieser Weg in verschiedenen Mauszelllinien mit Substanzen, die einerseits die Endozytose hemmen oder andererseits die Ansäuerung der Endosomen verhindern [11], inhibiert. Zu den eingangs erwähnten Substanzen gehört *Chlorpromazin*, welches die Bildung Clathrin-haltiger Vesikel hemmt, indem es das Adapterprotein AP-2 bindet und von der Plasmamembran entfernt [47] und somit die Clathrin-abhängige Endozytose verhindert [38, , 44, , 45, , 46]. Zur Neutralisierung der Umgebung mit niedrigem pH-Wert oder zur Unterbindung der endosomalen Ansäuerung wurden folgende lysosomotrope Agenzien verwendet: (I) *Ammoniumchlorid*, eine schwache Base, die in endosomalen Vesikeln akkumuliert und deren saures Milieu neutralisiert [5, , 30, , 39, , 59]. (II) *Monensin*, ein Ionophor, welches den Protongradienten über der endosomalen Membran zerstört und als schwache Base fungiert [28, , 40, , 48, , 49]. (III) *Bafilomycin A1* sowie *Concanamycin A* sind spezifische Inhibitoren der V-Typ H^+ -ATPase in eukaryotischen Zellen [36, , 39, , 40, , 60]. Die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen und Inhibitoren wurden anhand bereits durchgeführter Untersuchungen an Hüllviren gewählt, deren Infektivität nachweislich vom endosomalen/endozytotischen Weg abhängt [29, , 30, , 37, , 38, , 40, , 41, , 43, , 44, , 46, , 153, , 198]. Mittels DAPI-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit den beschriebenen Substanzen keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen hatte (nicht gezeigt).

Um den Einfluss der inhibitorischen Substanzen auf die Infektivität verschiedener muriner Zelllinien durch MHV-A59 zu testen, wurde der Plaqueassay durchgeführt (siehe Material und Methoden). Alle getesteten lysosomotropen Substanzen zeigen einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Infektivität durch MHV-A59. Bei Konzentrationen von 20 mM Ammoniumchlorid wurde eine Plaquereduktion von über 50% beobachtet. Der inhibitorische Effekt der anderen verwendeten Substanzen war noch eindeutiger. Die Virusreplikation war bei Konzentrationen von 10 nM Concanamycin A (Con, graugestreift), 100 nM Bafilomycin A1 (Baf A1, dunkelgrau) und 10 μ M Monensin (schwarz) fast vollständig inhibiert (Abbildung 20 A). Eine vollständige Inhibierung der Infektivität wurde auch nach Inkubation mit 15 μ M Chlorpromazin beobachtet (Abbildung 20, hellgrau).

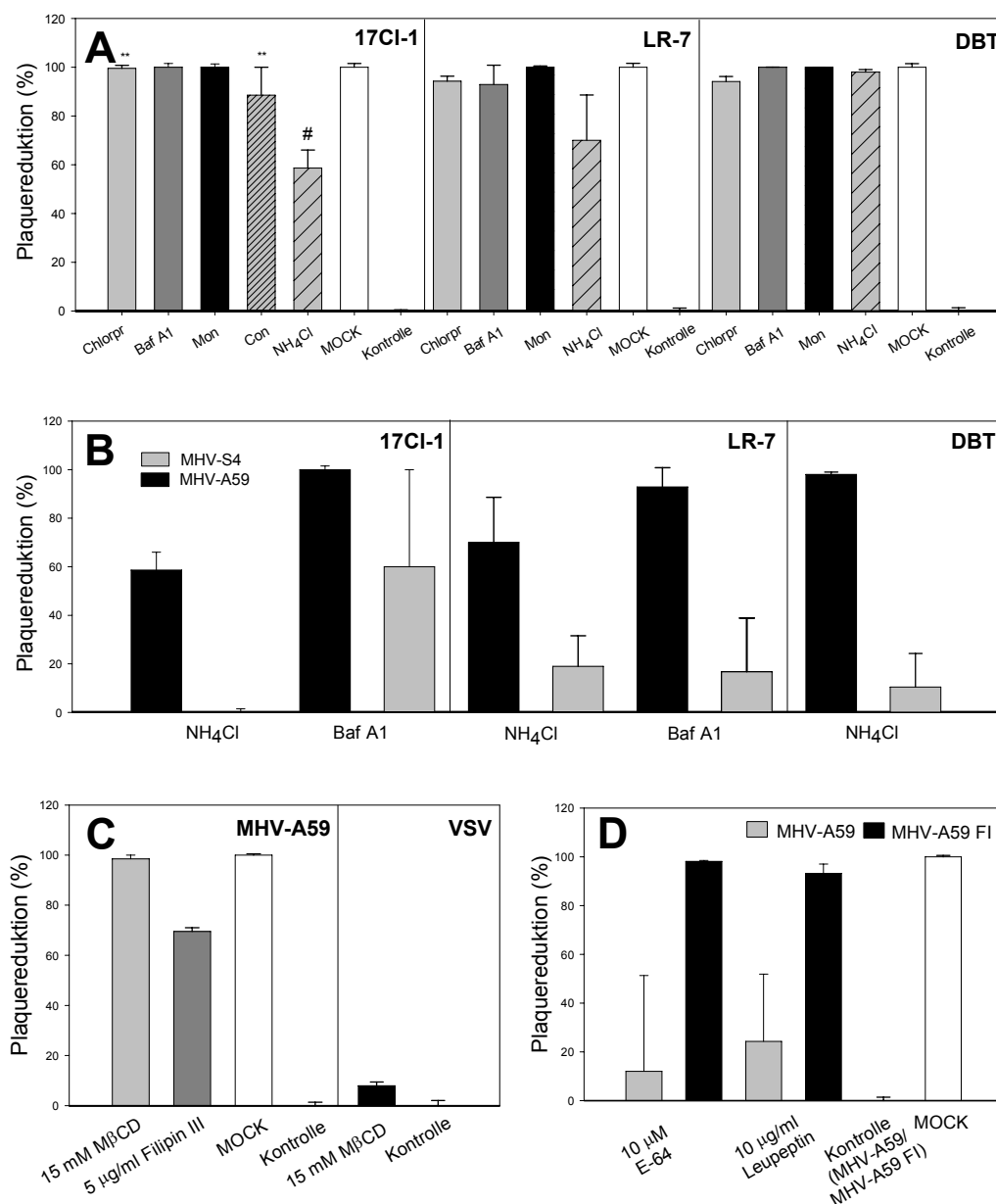


Abbildung 20: Einfluss inhibitorischer Substanzen auf die Infektivität von MHV-A59. Die Infektivität von MHV-A59 wurde über den Plaqueassay analysiert. (A) Inkubation der Zellen mit Chlorpromazin-HCl (Chlorpr, 15 μ M, grau), Bafilomycin A1 (Baf A1, 100 nM, dunkelgrau), Monensin (Mon, 10 μ M, schwarz), Concanamycin A (Con, 10 nM, graugestreift) und Ammoniumchlorid (NH₄Cl, breit graugestreift). (B) Die Zellen wurden mit 20 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl) oder 100 nM Bafilomycin A1 (Baf A1) behandelt und anschließend mit MHV-A59 (schwarz) oder MHV-S4 (grau) infiziert. (C) Einfluss der Cholesterolverarmung von 17Cl-1 Zellen auf die Infektivität von MHV-A59. Grau - M β CD, dunkelgrau - Filipin III. Als Kontrolle wurde VSV (schwarz) verwendet. (D) Einfluss der Proteaseinhibitoren E-64 und Leupeptin (Leu) auf die Infektivität von 17Cl-1 Zellen durch MHV-A59 (grau) und MHV-A59 FI (schwarz). Soweit nicht anders vermerkt, entsprechen die Daten dem Mittelwert des Standardfehlers von wenigstens drei unabhängigen Experimenten. (* - n=1; ** - n=2; # - n=4)

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erfolgreiche Infektion der Zellen durch MHV-A59 über den Clathrin-abhängigen, endozytotischen Weg erfolgt und als Hauptroute für den Eintritt des Virus dient. Zusätzlich scheint eine Umgebung mit niedrigem pH-Wert, wie sie in den endosomalen Kompartimenten der Zelle vorzufinden ist, Voraussetzung für die Freisetzung des Nukleokapsids in

das Cytoplasma der Zelle zu sein. Vergleichbare Experimente wurden mit LR-7 und DBT-Zellen, die ebenfalls durch MHV-A59 infizierbar sind, durchgeführt. Die Inkubation dieser Zellen mit den lysosomotropen Substanzen Ammoniumchlorid, Bafilomycin A1, Monensin und Chlorpromazin zeigen den gleichen inhibitorischen Effekt wie bei 17Cl-1 Zellen. Die Infektivität war nach Inkubation mit 100 nM Bafilomycin, 10 μ M Monensin oder 15 μ M Chlorpromazin vollständig unterdrückt (Abbildung 20 A). Nach Inkubation mit 20 mM Ammoniumchlorid konnte die Infektion bis zu 70% (LR-7) oder zu 100% (DBT) reduziert werden (Abbildung 20 A). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der bereits beobachteten Verzögerung der MHV-A59 Infektion Ammoniumchlorid-behandelter L2-Zellen [30]. Im Vergleich dazu bewahrte MHV-S4, ein rekombinantes Virus, welches das S-Protein von MHV-JHM exprimiert und den nicht-endozytotischen, clathrin-unabhängigen Weg des viralen Eintritts nutzt [145, , 153] seine Infektivität nach Behandlung der Zellen (17Cl-1, LR-7 oder DBT) mit 20 mM Ammoniumchlorid oder 100 nM Bafilomycin größtenteils bei (Abbildung 20 B). Für MHV-S4 infizierte LR-7 Zellen hatten Ammoniumchlorid und Bafilomycin A1 einen geringen Effekt auf die Infektivität (Abbildung 20, graue Balken). MHV-S4 infizierte DBT- und 17Cl-1 Zellen zeigten nach Inkubation mit Ammoniumchlorid ebenfalls keine signifikante Reduktion der Infektivität (Abbildung 20 B). Allerdings lag diese bei MHV-S4 infizierten 17Cl-1 Zellen, die mit Bafilomycin A1 behandelt wurden bei knapp 40% (Abbildung 20, links, grauer Balken).

Zusätzlich wurden Experimente zur Synzytienbildung virusinfizierter 17Cl-1 Zellen durchgeführt. Während für MHV-A59 infizierte 17Cl-1 Zellen 24 h nach Inokulation (p.i.) keine Synzytien beobachtet werden konnte und lediglich ein geringer Teil der Zellen 48 h p.i. Synzytien zeigte, wurde für MHV-S4 infizierte 17Cl-1 Zellen eine deutliche Synzytienbildung schon 24 h p.i. beobachtet (nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass MHV-S4 (JHM) im Gegensatz zu MHV-A59 keinen niedrigen pH-Wert benötigt und die Zell-Zell-Fusion bei neutralem pH-Wert ablaufen kann. Die partielle Inhibierung der Infektivität von MHV-S4 in 17Cl-1 Zellen durch Bafilomycin A1, die in LR-7 Zellen nicht beobachtet wurde, steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Nash und Buchmeier [28], die zeigen konnten, dass MHV-JHM je nach Zelltyp verschiedene Eintrittswege nutzen kann.

Neuere Studien gaben zusätzlich Hinweise darauf, dass der Eintritt umhüllter Viren in die Zielzelle mit Lipiddomänen assoziiert ist, die Cholesterol enthalten [26, , 52, , 53, , 54]. Nach der Komplexierung von Cholesterol und Verarmung der Plasmamembran von 17Cl-1 Zellen durch Inkubation mit 15 mM Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) (siehe Material und Methoden) konnte die Infektion mit MHV-A59 vollständig blockiert werden (Abbildung 20 C). Eine Inhibierung der Infektion bis zu 70% wurde nach Inkubation der Zellen mit der cholesterol-bindenden Substanz Filipin III (5 μ g/ml) beobachtet (Abbildung 20 C). In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die eingesetzten Konzentrationen den Eintritt und die Infektivität von umhüllten Viren effizient inhibieren können [26, , 52, , 53]. Die gewonnenen Daten sind ein weiterer Beweis für die

Notwendigkeit von Cholesterol und/oder Cholesterol-reichen Membrandomänen für den Eintritt und die Infektivität von MHV-A59, wie dies bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte [52, , 54] . Als Kontrolle wurden 17Cl-1 Zellen ferner mit VSV infiziert. VSV kann unabhängig von Cholesterol und/oder Cholesterol-reichen Membrandomänen (Rafts) in die Zelle eindringen [199, , 200] . Eine geringe Reduktion der VSV-Infektivität von 8% wurde für Zellen beobachtet, die mit M β CD behandelt wurden (Abbildung 20 C). Diese Ergebnisse stützen die Aussage, dass der Haupteintrittsweg von MHV-A59 der endozytotische Weg ist, da frühere Untersuchungen zur Clathrin-abhängigen Endozytose zeigen konnten, dass diese Cholesterol-abhängig ist und nach Behandlung der Zellen mit M β CD inhibiert werden kann [61, , 201] .

D.4.2 Proteaseinhibitoren haben keinen Einfluss auf die Infektivität von MHV-A59

Ferner gibt es Hinweise darauf, dass die Spaltung des S-Proteins von Coronaviren essentiell für deren Fusionsaktivität ist. Abhängig vom Virusstamm erfolgt die Spaltung bereits während der Maturierung in der Wirtszelle. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Fusionsaktivität/Infektivität von Coronaviren, wie SARS-CoV und MHV-2 von der proteolytischen Spaltung des S-Proteins durch endosomale Proteasen abhängt [5, , 6, , 202] . Um diese Frage zu adressieren und zu untersuchen, ob eine solche Spaltung auch für die Fusion von MHV-A59 wichtig ist, wurden 17Cl-1 Zellen in der Anwesenheit von Leupeptin und E-64, Proteaseinhibitoren, die Proteasen, wie Cathepsin L in endosomalen Organellen mit niedrigem pH-Wert inhibieren, mit MHV-A59 infiziert. Diese Inhibitoren wurden in anderen Studien bereits in vergleichbaren Konzentrationen eingesetzt [4, , 5, , 6] . In den durchgeführten Experimenten wurde für die Inhibitoren - Leupeptin und E-64 - ein geringer Einfluss auf die Infektivität von MHV-A59 beobachtet (Abbildung 20 D, graue Balken). Die virale Replikation war nur zu 20% für Leupeptin (10 μ g/ml) und zu 30% für E-64 (10 μ M) reduziert. Vermutlich spielen endosomale Proteasen bei der Infektion und Auslösung der Fusionsreaktion von MHV-A59 eine untergeordnete Rolle. Um die Effektivität der eingesetzten Konzentrationen der Proteaseinhibitoren zu verifizieren, wurden 17Cl-1 Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren mit MHV-A59 FI infiziert. MHV-A59 FI exprimiert ausschließlich ungespaltenes S-Protein (siehe Material und Methoden). In Abwesenheit der Proteaseinhibitoren war die Infektivität von MHV-A59 FI vergleichbar mit der von MHV-A59 (Abbildung 20 D, Kontrolle). Im Vergleich zu MHV-A59 (graue Balken) konnte die Infektivität von MHV-A59 FI vollständig inhibiert werden, nachdem die Zellen mit den Inhibitoren Leupeptin (10 μ g/ml) oder E-64 (10 μ M) behandelt wurden (Abbildung 20 D, schwarze Balken).

D.5 Charakterisierung der Fusionsaktivität von MHV-A59 und SARS-CoV

Der Auslöser der Konformationsumwandlung des S-Proteins von MHV-A59, welcher das Protein von einem fusionskompetenten/metastabilen in einen fusionsaktiven Zustand versetzt, ist noch unbekannt. Zur Charakterisierung der Konformationsänderung des S-Proteins von MHV-A59

wurde die Fusionsaktivität bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten untersucht, um die physikochemischen Bedingungen zu identifizieren, die für eine Strukturveränderung im viralen Fusionsprotein verantwortlich sind. Im wesentlichen kamen zwei Methoden zum Einsatz: (1) Die Fluoreszenzspektroskopie und (2) die Epi- und Konfokalfluoreszenzmikroskopie. Beide Methoden nutzen das Phänomen des Fluoreszenzdequenching des Membranmarkers R_{18} nach Verteilung in der Lipidmembran zur Visualisierung der Fusionsreaktion zwischen viraler und zellulärer Membran.

D.5.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Fusion von MHV-A59

Um die durch den Plaquereduktionsassay gewonnenen Hinweise darauf, dass die Fusion von Virus und Plasmamembran nur bei niedrigem pH-Wert effizient ablaufen kann, zu untermauern, wurde der Lipid-Mischungs-Assay basierend auf dem Dequenching des R_{18} -Fluorophors angewandt [193]. Viren, die mit R_{18} in selbstlöschender Konzentration markiert wurden, wurden mit den Zielzellen bei 4°C inkubiert, um die Bindung zu ermöglichen. Anschließend wurden die Virus-Zell-Komplexe in einer Küvette bei neutralem pH (7.0) und 37°C für 30 min inkubiert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Zitronensäure (250 mM) auf pH 5.0 erniedrigt (siehe Material und Methoden). Es konnte ein starker und schneller Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Dieser wurde der Aufhebung der Selbstlöschung durch die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Zielzelle und der damit verbundenen Erhöhung der Fluoreszenzintensität zugeschrieben (Abbildung 21 A). Nach 600 sec waren ca. 25-30% der Viren fusioniert. Längere Inkubation zeigte ein kontinuierliches moderateres Fluoreszenzdequenching, welches bis zu einem Wert von 40% anstieg. Das Dequenching des Fluorophors war ferner temperaturabhängig. Bei 20°C konnte noch immer ein signifikantes Dequenching beobachtet werden, dies erreichte allerdings ein geringeres Ausmaß (Abbildung 21 B). Im Vergleich dazu wurde bei neutralem pH-Wert (pH 7.0) ein kontinuierlicher, aber sehr schwacher Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 37°C beobachtet (Abbildung 21 A). Dieser mündete in ein sehr viel geringeres Fusionsausmaß von unter 10%. Vermutlich hing dieser langsame Fluoreszenzanstieg mit dem unspezifischen Übergang des Fluorophors von viraler zu zellulärer Membran oder mit intrazellulären Fusionsereignissen zusammen.

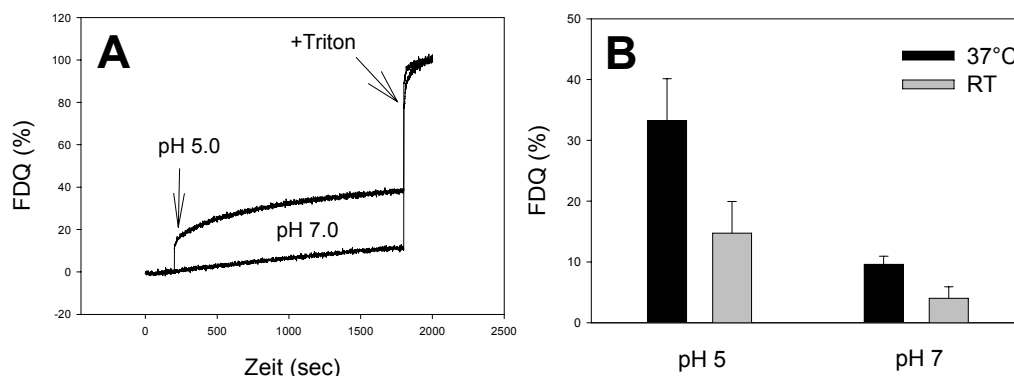


Abbildung 21: Die Fusion von MHV-A59 mit 17Cl-1 Zellen kann durch Erniedrigung des pH-Wertes ausgelöst werden. Nach Bindung R₁₈-markierter Viren an 17Cl-1 Zellen wurde das Fluoreszenzdequenching (FDQ) der Virus-Zell-Komplexe in Suspension verfolgt (siehe Material und Methoden). (A) Zeitverlauf des R₁₈ Fluoreszenzdequenching gemessen bei neutralem (pH 7.0) und niedrigem pH-Wert (pH 5.0). Um den pH-Wert auf 5.0 zu erniedrigen, wurde Zitronensäure (250 mM) zugegeben (Pfeil). Am Ende des Experiments wurde Triton X-100 hinzugefügt, um ein vollständiges Dequenching zu erreichen (+Triton, Pfeil). (B) Ausmaß des Fluoreszenzdequenching (FDQ) nach Messung für 30 min unter den beschriebenen Bedingungen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert des Standardfehlers von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Als Kontrolle wurde der Fluoreszenzanstieg unter den beschriebenen Bedingungen bei 4°C durchgeführt, bei dem keinerlei Fluoreszenzdequenching beobachtet werden konnte (nicht gezeigt). Die letzte Beobachtung war konsistent mit den mikroskopischen Fluoreszenzdaten. Die R₁₈-Markierung von MHV-A59 hatte keinen Einfluss auf die Infektivität des Virus. Dies konnte durch den Plaqueassay verifiziert werden (nicht gezeigt).

D.5.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Fusion von MHV-A59

Um die in den virologischen (Plaqueassay) und fluoreszenzspektrometrischen Experimenten gewonnenen Hinweise darauf, dass ein niedriger pH-Wert die Fusion zwischen viraler und zellulärer Membran auslösen kann, zu untermauern, wurden fluoreszenzmikroskopischen Analysen durchgeführt. Zur Visualisierung der Fusion von MHV-A59 wurden die Viren mit R₁₈ markiert und mit 17Cl-1 Zellen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Virus-Zell-Komplexe bei 37°C entweder bei neutralem pH (pH 7.0) oder niedrigem pH (pH 5.0) inkubiert, um die Bedingungen des endosomalen Kompartiments zu simulieren (siehe Material und Methoden). Zum Zeitpunkt t=0 konnte eine punktförmige Fluoreszenz beobachtet, welche den entsprechenden an die Plasmamembran der Zielzelle gebundenen Viren zugeordnet werden konnte. Gemäß der Größe der Fluoreszenzpunkte liegt eine gewisse Anzahl der Viren co-lokalisiert oder aggregiert vor (Abbildung 22 D). Ein ähnliches Fluoreszenzbild ergab sich 5 min nach Inkubation bei neutralem pH (Abbildung 22 A). Allerdings wurde erst 15 min nach Inkubation bei pH 7.0 und 37°C ein sehr schwaches R₁₈-Signal entsprechender intrazellulärer Kompartimente beobachtet (Abbildung 22 C). Vermutlich spiegelt diese Markierung die Lokalisierung von MHV-A59 in Endosomen und die anschließende Fusion mit der endosomalen Membran wider. Dies konnte durch die Beobachtung

gestützt werden, dass keinerlei intrazelluläre Färbung nach 15-minütiger Inkubation bei neutralem pH und Raumtemperatur festgestellt werden konnte (nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass die Endozytose bei Raumtemperatur nur sehr eingeschränkt stattfinden kann [203] .

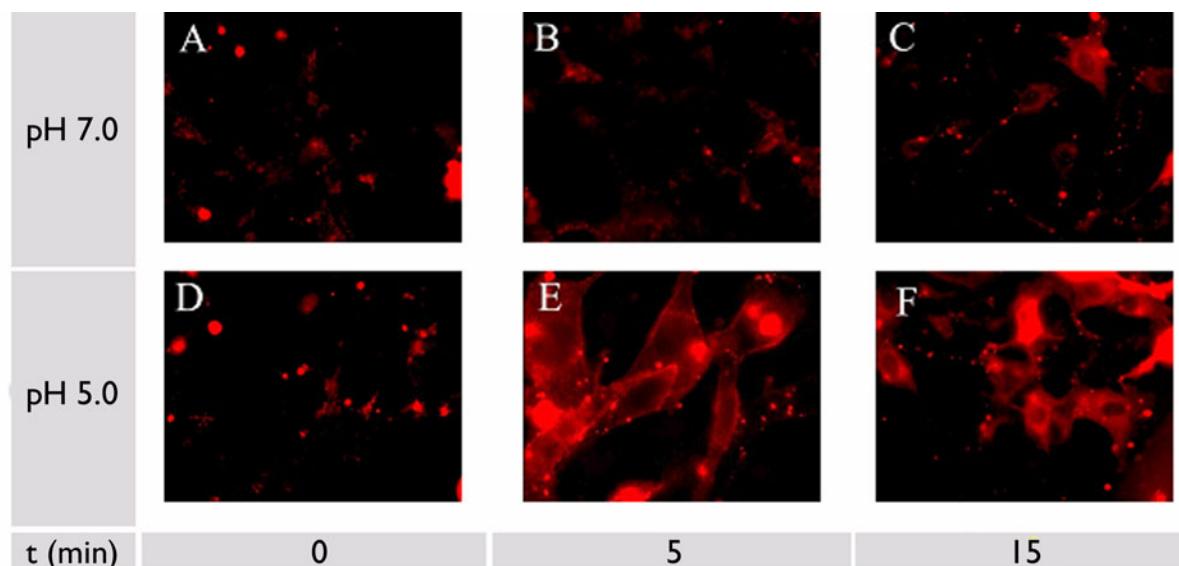


Abbildung 22: Niedriger pH-Wert induziert die Fusion von MHV-A59 mit der Plasmamembran von 17Cl-1 Zellen. R₁₈-markierte Viren wurden bei 4°C an die entsprechenden Zielzellen gebunden. Anschließend wurden die Virus-Zell-Komplexe bei 37°C entweder bei neutralem (pH 7.0, A-C) oder niedrigem pH-Wert (pH 5.0, D-F) inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Mild saure Bedingungen (pH 5.0, D-F) simulieren das Milieu des endosomalen Kompartiments und ermöglichen dem Virus die direkte Fusion mit der Plasmamembran der Zielzelle (E). Fusion der Viren mit der Plasmamembran konnte bei neutralem pH nicht beobachtet werden (A und B). Nach 15 min wurde lediglich eine schwache intrazelluläre Färbung festgestellt (C).

Im Vergleich zur Inkubation bei pH 7.0 wurde eine starke Verteilung des Fluorophors R₁₈ über die gesamte Plasmamembran bereits 5 min nach Inkubation bei pH 5.0 und 37°C beobachtet (Abbildung 22 E). Dies impliziert eine schnelle, effiziente Fusion der viralen Hüllmembran mit der Plasmamembran der Zielzelle unter diesen Bedingungen. Längere Inkubation bis zu 15 min (t=15) führte zu keinem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz der Plasmamembran (Abbildung 22 F). Um diese Beobachtungen zu untermauern und die pH-abhängige Fluoreszenzmarkierung der Virus-Zell-Komplexe detaillierter zu analysieren, wurden konfokalmikroskopische Studien durchgeführt. Dazu wurden 17Cl-1 Zellen mit den R₁₈-markierten MHV-A59 Virionen für 30 min bei 37°C und neutralem pH-Wert (pH 7.0) inkubiert und fluoreszenzgefärbte zelluläre Organellen beobachtet, die vermutlich Endosomen entsprachen. Diese erschienen angefüllt mit fluoreszenzmarkierten Viren oder die Viren waren bereits mit diesen Organellen fusioniert (Abbildung 23 A und B, Pfeilspitzen). Dies konnte durch die Analyse eines 3D-Stacks konfokaler Bilder (Abbildung 23 A) und der anschließenden Erstellung eines Fluoreszenzplots entlang der x- und y-Achsen, die eine Seitenansicht ermöglichte (Abbildung 23 B), verifiziert werden. Eine Markierung der Plasmamembran wurde unter neutralen pH-Bedingungen nicht beobachtet.

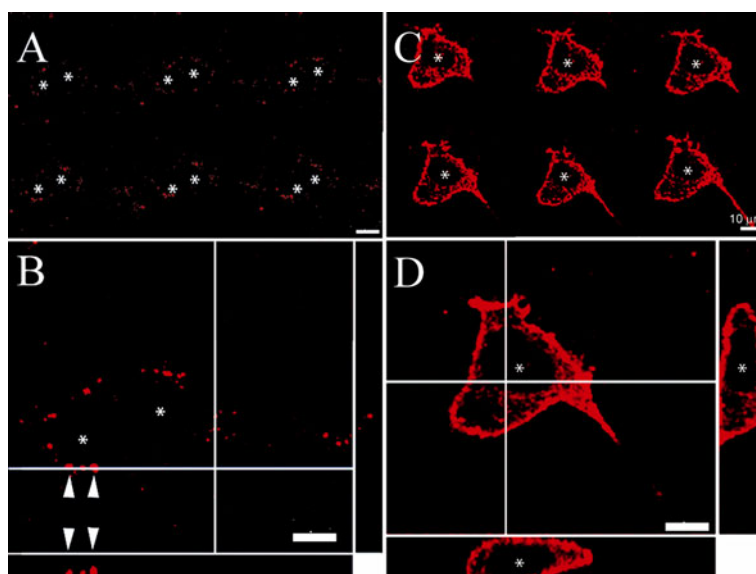


Abbildung 23: Konfokalmikroskopische Analyse der Fusionseigenschaften von MHV-A59. (A und B) Inkubation der Virus-Zell-Komplexe bei neutralem pH-Wert. Analyse des 3D-Stacks konfokaler Bilder. (C und D) Nach Simulation des endosomalen/lysosomalen Milieus durch Inkubation der Virus-Zell-Komplexe bei pH 5.0. Analyse der 3D-Stacks konfokaler Fluoreszenzbilder (siehe Material und Methoden). Balken: 10 μ m. Sterne entsprechen der Position des Zellkerns.

Im Gegensatz dazu zeigen Virus-Zell-Komplexe nach Inkubation bei pH 5.0 und 37°C schon nach 5 min eine starke Fluoreszenz, die über die gesamte Plasmamembran der Zelle verteilt ist (Abbildung 23 C und D). Die Fusion der Viren mit der Zielzelle findet unter niedrigen pH-Bedingungen, die das Milieu der Endosomen/Lysosomen simuliert, effizient und schnell, direkt an der Plasmamembran der Zielzelle statt. Die Analyse der konfokalen 3D-Stacks sowie die Erstellung konfokaler Fluoreszenzplots entlang der x- und y-Achsen konnten bestätigen, dass ausschließlich die Plasmamembran der Zelle gefärbt war (Abbildung 23 D). Um zu klären, ob die beobachtete punktförmige intrazelluläre R₁₈-Fluoreszenz bei neutralem pH mit der Fusion der Viren mit der endosomalen Membran zusammenhing, wurden 17Cl-1 Zellen mit 20 mM Ammoniumchlorid vorinkubiert und die intrazelluläre Färbung nach Inkubation der Virus-Zell-Komplexe bei pH 7.0, 37°C für 30 min in Anwesenheit des Inhibitors analysiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen unter gleichen Bedingungen analysiert (Abbildung 24 B). Diese Zellen zeigen eine ähnliche zelluläre Markierung kleiner, zellulärer Organellen wie bereits beschrieben. Für die Zellen, die mit Ammoniumchlorid behandelt wurden, zeigte sich eine andere intrazelluläre Markierung. Das Fluoreszenzsignal war geringer und eher schwach (Abbildung 24 A). Vermutlich konnten einige Viren internalisiert werden (punktförmige Fluoreszenz), die eigentliche Fusion mit der endosomalen Membran jedoch konnte durch die lysosomotrope Aktivität des Ammoniumchlorids verhindert werden. Zu bemerken war außerdem, dass die punktförmigen Fluoreszenzsignale an der Plasmamembran der Kontrollzellen auch noch 30 min nach Inkubation zu beobachten waren. Diese entspricht vermutlich Viren, die noch nicht über Endozytose in die

Zellen aufgenommen wurden. Zusätzlich untermauern diese Beobachtungen die Erkenntnis, dass MHV-A59 unter neutralen pH-Bedingungen nicht fähig ist mit der Plasmamembran zu fusionieren, wie dies für Virus-Zell-Komplexe der Fall ist, die bei niedrigem pH inkubiert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Zellen erzielt, die mit Bafilomycin A1 inkubiert wurden (nicht gezeigt).

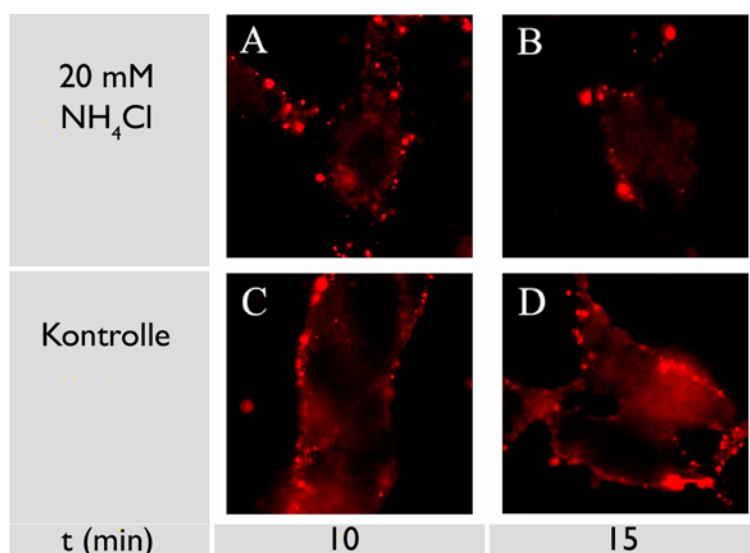


Abbildung 24: Die Inkubation der Zellen mit Ammoniumchlorid verhindert die intrazelluläre Markierung bei neutralem pH. 17Cl-1 Zellen wurden mit Ammoniumchlorid vorinkubiert (A und B – 20 mM NH_4Cl) oder bleiben unbehandelt (C und D – Kontrolle) (siehe Material und Methoden). Anschließend werden R_{18} -markierte MHV-A59 an die Zielzellen gebunden und die Virus-Zell-Komplexe bei 37°C für die angegebenen Zeiten inkubiert (siehe Material und Methoden). Ammoniumchlorid ist während der gesamten Infektions- und der Inkubationszeit zugegen.

Das intrazelluläre Markierungsmuster der Zellen, die mit fluoreszenzmarkierten MHV-A59 bei pH 7.0 und 37°C in der Anwesenheit der Proteaseinhibitoren E-64 und Leupeptin inkubiert wurden, ist analog zu dem bei den unbehandelten Kontrollzellen beobachteten (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse untermauern, dass eine zusätzliche Spaltung des S-Proteins von MHV-A59 in der Zielzelle nicht notwendig ist, um die Virus-Zell-Fusion zu induzieren, da es im maturierten Virus bereits gespalten vorliegt.

D.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Fusionseigenschaften von SARS-CoV

Das Fusionsverhalten S-Protein exprimierender Zellen zur Identifizierung des Auslösers der SARS-CoV vermittelten Fusion wurde im weiteren Verlauf der Experimente fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zielzellen tragen den humanen ACE2-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Zur Visualisierung der Zell-Zell-Fusion werden die Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und die Fusion unter verschiedenen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur,

Proteasen) untersucht. Die Volllängenvarianten der Proteine werden in den entsprechenden Zellsystemen exprimiert (siehe D.1 und Material und Methoden).

Zunächst wird das Expressionsniveau der Proteine in den entsprechenden Zellsystemen überprüft. Für die Detektion der Proteine auf der Oberfläche der Zellen und zur Überprüfung der korrekten Lokalisierung in der Plasmamembran werden die Zellen mit einem gegen das Protein gerichteten Primärantikörper und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, der zusätzlich mit einem Fluorophor gekoppelt ist, inkubiert (siehe Material und Methoden). Für das S-Protein und den ACE2-Rezeptor konnte bestätigt werden, dass beide Proteine in der Plasmamembran auf der Oberfläche der Zellen lokalisiert sind (Abbildung 25).

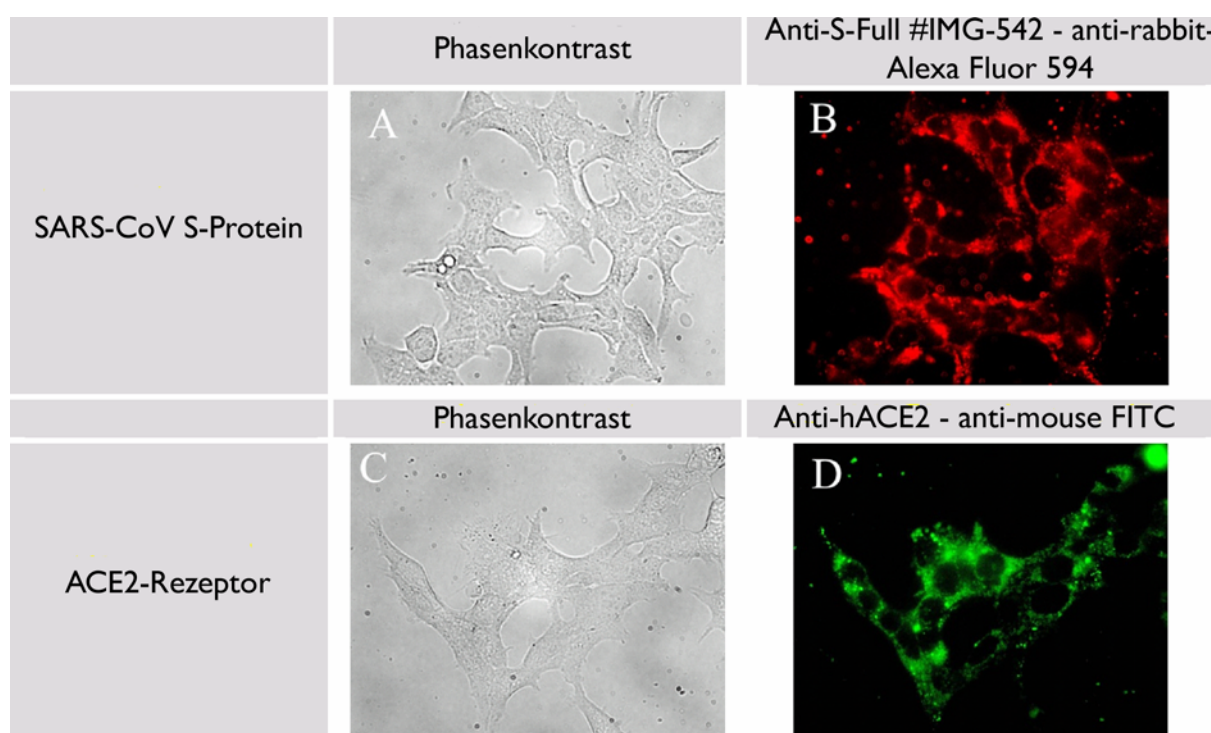


Abbildung 25: Die Lokalisierung des S-Proteins von SARS-CoV und des ACE2-Rezeptors in HEK293T-Zellen. Die Detektion der Volllängenvarianten des S- und ACE2-Proteins erfolgte durch Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern anti-S-Full #IMG-542 gegen das S-Protein und anti-hACE2 gegen den ACE2-Rezeptor. Die Sekundärantikörper waren jeweils mit verschiedenen Fluorophoren gekoppelt (siehe Material und Methoden). Die Aufnahmen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Für die Fusionsexperimente war es außerdem wichtig die S-Protein exprimierenden HEK293T Zellen (HEK293T-S) zusätzlich mit einem zellulären Farbstoff zu markieren. Dazu wurden diese parallel mit dem pEYFP-N1-Plamid transfiziert, welches die Information für eine Variante des GFP-Proteins – EYFP – enthält. EYFP liegt nach Expression löslich in der Zelle vor (nicht gezeigt). Die Überprüfung der Co-Expression von pEYFP und S-Protein ergab allerdings, dass keine der pEYFP-positiven Zellen auch S-Protein auf ihrer Oberfläche exprimierten (nicht gezeigt). Demzufolge wurden die Zellen für die folgenden Fusionsexperimente mit anderen cytosolischen Markern markiert (siehe Material und Methoden).

Die Fusion S- und ACE2-exprimierender Zellen wurde einerseits nach Inkubation unter neutralen pH-Bedingungen beobachtet, benötigte dazu jedoch die zusätzliche Inkubation mit Trypsin (Abbildung 26 B). Andererseits wurde auch nach Inkubation der Zell-Zell-Komplexe bei niedrigem pH-Wert (pH 5.0) Fusion beobachtet, die allerdings ohne Zugabe von Trypsin ausgelöst werden konnte (Abbildung 26 A). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine erfolgreiche Fusion in Anwesenheit des ACE2-Rezeptors bei neutralem pH-Wert eine Spaltung des S-Proteins voraussetzt. Allerdings kommt es allein durch die Erniedrigung des pH-Wertes ohne Zugabe von Trypsin in Anwesenheit des Rezeptors zu einer Konformationsumwandlung im S-Protein, die ausreichend ist, um Zell-Zell-Fusion auszulösen. Die Expression der jeweiligen Proteine wurde über Westernblot analysiert (siehe Material und Methoden). Sowohl S- als auch ACE2-Protein konnten in den Lysaten der fusionierten Zellen nachgewiesen werden. Die untransfizierte Kontrolle (K) war nach Inkubation mit dem anti-ACE2 Antikörper positiv für den ACE2-Rezeptor, da VeroE6-Zellen diesen endogen exprimieren (Abbildung 26). Da die Expression mit dem cytosolischen Marker pEYFP nicht zu den gewünschten Transfektionsraten führte und eine Co-Expression von S- und pEYFP-Protein nicht nachgewiesen werden konnte, wurden im weiteren Verlauf der Experimente die HEK293T-S Zellen mit dem cytosolischen Marker Calcein-AM markiert (siehe Material und Methoden).

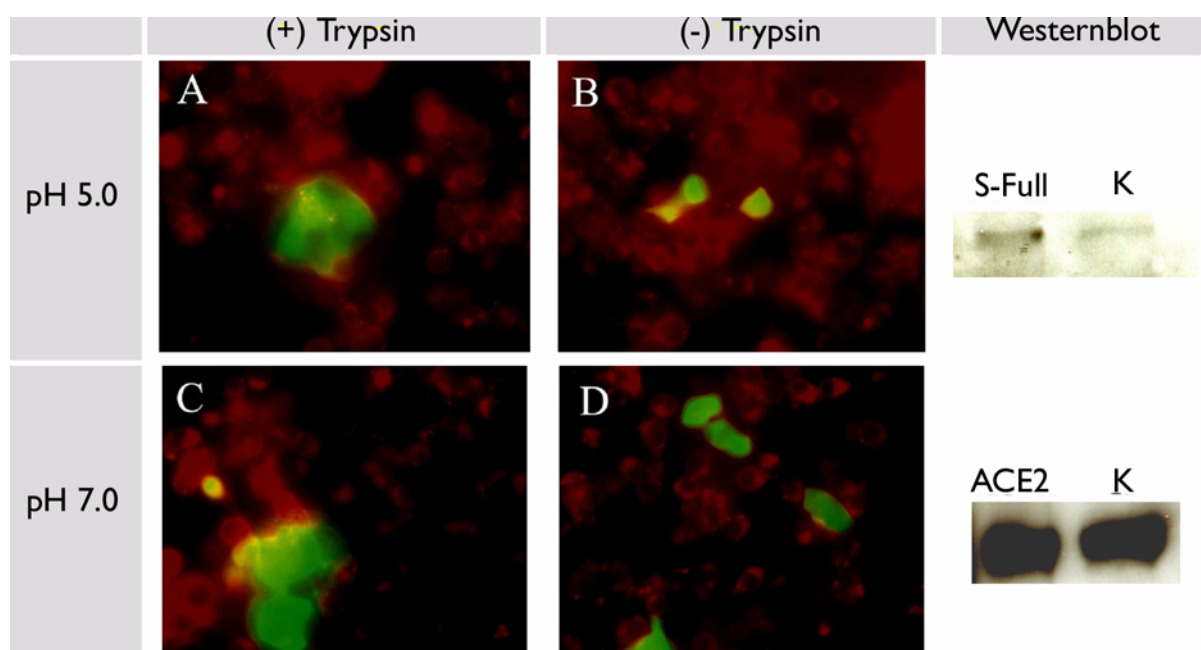


Abbildung 26: Fusion von HEK293T-S Zellen mit VeroE6-ACE2 Zellen. Die Inkubation der Zell-Zell-Komplexe erfolgt entweder bei pH 5.0 (A und B - obere Zeile) oder bei pH 7.0 (C und D) mit (+) oder ohne (-) Trypsinbehandlung und 37°C. S-Protein exprimierende HEK293T-S Zellen wurden zusätzlich mit dem cytosolischen Protein pEYFP transfiziert (grün). ACE2-Rezeptor exprimierende VeroE6-ACE2 werden mit R₁₈ markiert (rot). Nach Überlagerung der Fluoreszenzbilder sind fusionierte Zellen/Zellbereiche gelb (Co-Lokalisierung). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde ein Westernblot angefertigt (rechte Spalte), (siehe Material und Methoden). K - untransfizierte Kontrolle.

Zur Untersuchung der Fusion von S-Protein und ACE2-Rezeptor exprimierenden Zellen werden VeroE6-ACE2 Zellen mit dem Membranmarker R₁₈ (rot) und HEK293T-S Zellen mit dem cytosolischen Marker Calcein-AM (grün) markiert. Ein deutliches Mischen der (1) Membranlipide (rot) und des (2) Cytosols (grün) kann nach Inkubation bei pH 5.0 und Zugabe von Trypsin (+) beobachtet werden (Abbildung 27 A). Dies deutet auf eine vollständige Zell-Zell-Fusion hin. Diese ist einerseits durch das Mischen der Lipide („Lipid Mixing“, R₁₈ -rot) und andererseits durch das Mischen des cytosolischen Inhalts („Content Mixing“, Calcein-AM (grün)) charakterisiert. Im Gegensatz dazu wird ohne Zugabe von Trypsin (-) unter niedrigen pH-Bedingungen (pH 5.0) sowie unter neutralen pH-Bedingungen mit (+) oder ohne (-) Trypsin lediglich die Mischung der Lipide („Lipid Mixing“) beobachtet (Abbildung 27 B-D).

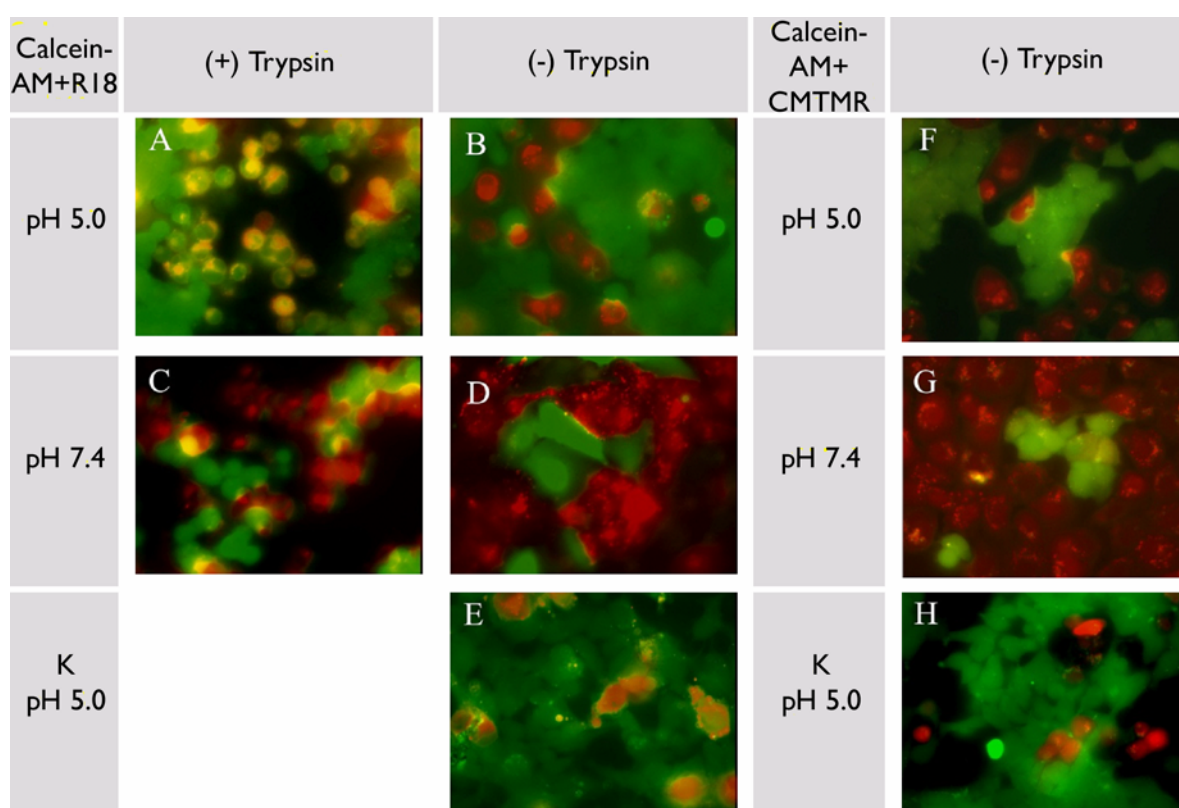


Abbildung 27: Untersuchung der Fusion S-Protein und ACE2-Rezeptor exprimierender Zellen. (A-D) Zur Untersuchung der Zell-Zell-Fusion wird die Membran der VeroE6-ACE2 Zellen mit R₁₈ markiert (rot). Das Cytosol der HEK293T-S Zellen wird mit dem cytosolischen Marker Calcein-AM markiert (grün) (siehe Material und Methoden). Die Inkubation der Zellen erfolgt bei niedrigem (pH 5.0) oder bei neutralem pH-Wert (pH 7.4) mit (+) oder ohne (-) die Zugabe von Trypsin. (F-H) Untersuchung der Zell-Zell-Fusion von Calcein-AM – HEK293T-S Zellen (grün) und CMTMR-VeroE6-ACE2 Zellen (rot) unter niedrigen oder neutralen pH-Bedingungen ohne Inkubation mit Trypsin (-). Als Kontrollen (K) werden nicht-transfizierte HEK293T-Zellen mit VeroE6-Zellen unter niedrigen pH-Bedingungen und 37°C analysiert.

Dies deutet auf Hemifusion hin. Die äußeren Leaflets verschmelzen, eine vollständige Fusion findet jedoch nicht statt. Ähnliches kann außerdem nach Inkubation Calcein-AM gefärbter HEK293T-S Zellen (grün) mit CMTMR-gefärbten VeroE6-ACE2 Zellen (rot) beobachtet werden (Abbildung 27 F-H). Unter diesen Bedingungen (pH 5.0 und pH 7.0, jeweils ohne Trypsin (-)) findet

keine vollständige Zell-Zell-Fusion statt (Abbildung 27 F-H). Die jeweiligen Kontrollexperimente mit nicht-transfizierten Zellen werden bei pH 5.0 ohne Trypsinbehandlung (-) durchgeführt. Keine der Kontrollen zeigt Zell-Zell- oder Hemifusion (Abbildung 27 E und H).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass eine vollständige Zell-Zell-Fusion („Content“- und „Lipid-Mixing“) von HEK293T-S und VeroE6-ACE2 Zellen erst nach Inkubation bei pH 5.0 nach proteolytischer Spaltung (Trypsin) und 37°C ausgelöst werden kann. Zusätzlich kommt es nach Inkubation bei niedrigem pH-Wert auch ohne die Zugabe von Trypsin zur so genannten Hemifusion („Lipid-Mixing“) (Abbildung 27 B-D). Im Gegensatz dazu wird „Content-Mixing“ ohne Trypsin (-), weder unter neutralen noch unter niedrigen pH-Bedingungen beobachtet (Abbildung 27 F und G). Vermutlich wird allein durch die Interaktion mit dem ACE2-Rezeptor eine Konformationsänderung im S-Protein ausgelöst, welche zur Fusion der äußeren Leaflets von viraler und zellulärer Membran führt. Unklar bleibt, welche Rolle ein niedriger pH-Wert bei der Auslösung der Konformationsänderung/Fusionsreaktion spielt. Zum einen könnte die pH-Erniedrigung notwendig sein, um die für die Spaltung des S-Proteins erforderliche endosomale Protease zu aktivieren [6] oder sie ist direkt an der Initiierung der Konformationsumwandlung des S-Proteins beteiligt. Außer Frage steht die Notwendigkeit des ACE2-Rezeptors für die Initiierung der Konformationsumwandlung im S-Protein, da Kontrollzellen ohne ACE2-Rezeptormolekül nicht fähig sind mit S-Protein exprimierenden Zellen zu fusionieren (nicht gezeigt). Zusätzlich sind Zellen, die kein S-Protein exprimierten unter den getesteten Bedingungen (pH 5.0, 37°C) fusionsinkompetent (Abbildung 27 E und H). Die Initiierung der Konformationsänderung im S-Protein von SARS-CoV und die anschließende Auslösung der Fusion ist somit von 3 Faktoren abhängig: (1) Von der Interaktion mit dem ACE2-Rezeptor. (2) Von der anschließenden und/oder gleichzeitigen proteolytischen Spaltung des S-Proteins durch eine Protease (endosomale, zelluläre oder extrazelluläre) und (3) einem niedrigen pH-Wert (pH 5.0), der durch ein zelluläres Organell mit niedrigem pH-Wert bereitgestellt werden muss.

D.6 Irreversibilität der Konformationsumwandlung des S-Proteins von MHV-A59

Zur Analyse der Konformationsumwandlung im S-Protein von MHV-A59 werden die Viren bei einem pH-Wert von 5.0 in Abwesenheit der Ziellmembran inkubiert. Die Inkubation R₁₈-markierter Viren erfolgt entweder bei 37°C oder 4°C (siehe Material und Methoden). Vor Bindung der Viren an die Zellen wird die Suspension neutralisiert. Anschließend werden die Virus-Zell-Komplexe bei pH 5.0 oder pH 7.0, 37°C inkubiert und epifluoreszenzmikroskopisch oder fluoreszenzspektrometrisch analysiert. Ferner wird die Infektivität vorinkubierter, nicht-markierter Viren im Plaqueassay getestet.

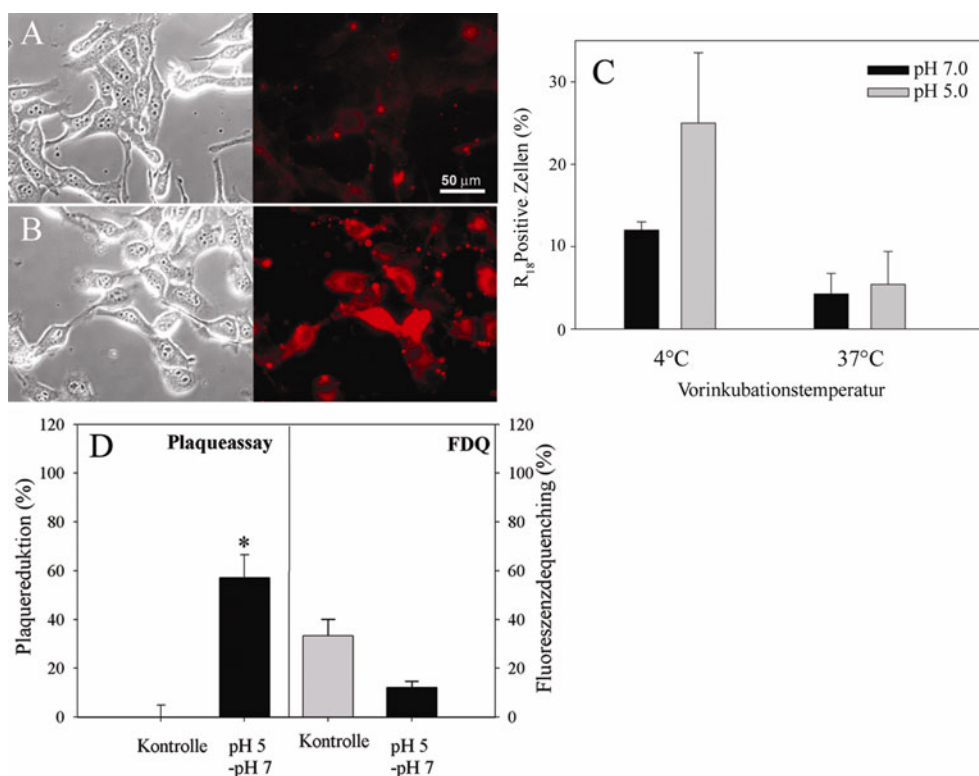


Abbildung 28: Die Fusionsaktivität und Infektivität von MHV-A59 kann durch Vorinkubation bei niedrigem pH-Wert beeinträchtigt werden. R₁₈-markierte Viren werden bei niedrigem pH-Wert für 15 min bei 37°C (A) oder 4°C (B) inkubiert. Nach Neutralisierung werden die so behandelten Viren an 17Cl-1 Zellen gebunden. Die Virus-Zell-Komplexe werden anschließend bei pH 5.0 und 37°C inkubiert. (A und B) Links – Phasenkontrast, Rechts – Fluoreszenzbilder. (C) Quantifizierung der Zellen, die eine Fusion zwischen R₁₈-markiertem Virus und der Plasmamembran zeigen. Schwarze Balken – Inkubation bei pH 7.0, graue Balken – Inkubation bei pH 5.0. (D) Plaqueassay und FDQ-Assay vorinkubierter MHV-A59 Viren (siehe Material und Methoden). Die Werte entsprechen dem Mittelwert des Standardfehlers von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Werden fluoreszenzmarkierte Viren in Abwesenheit von Rezeptor und Zielmembran bei niedrigem pH und 37°C inkubiert, so kommt es zu einem irreversiblen Verlust der Fusionsaktivität (Abbildung 28 A, C und D). Selbst nach Neutralisierung der Inkubationslösung findet keine Reaktivierung der Fusionsaktivität statt. Dagegen zeigen die Virionen nach Inkubation bei 4°C und pH 5.0 eine unveränderte Fusionsaktivität (Abbildung 28 B und C). Diese Experimente lassen vermuten, dass ein niedriger pH-Wert und erhöhte Temperaturen eine irreversible Konformationsänderung im S-Protein von MHV-A59 auslösen können, ohne die Anwesenheit des Rezeptors zu erfordern. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Hypothese einer irreversiblen Konformationsumwandlung im S-Protein, welche durch einen niedrigen pH-Wert bei 37°C ausgelöst werden kann, ist vermutlich auch die Infektivität und Fusionsaktivität des Virus beeinträchtigt. Nach Auswertung des Plaqueassays ist die Infektivität vorinkubierter Viren bis zu 60% reduziert (Abbildung 28 D, Plaqueassay). Zusätzlich wird eine Reduktion der Fusionsaktivität für Viren beobachtet, die bei pH 5.0 und 37°C vorinkubiert wurden. Das Fusionsausmaß sinkt von 40% für unbehandelte Viren (Kontrolle) auf weniger als 10% für vorinkubierte MHV-A59 (Abbildung 29 D, FDQ).

D.7 Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59

D.7.1 Die Sequenz und Primärstruktur des Spikeproteins von MHV-A59

Ausgehend von der primären Aminosäuresequenz des S-Proteins von MHV-A59 werden die bekannten Kriterien für Fusionspeptide herangezogen (Einleitung, Material und Methoden). Der erste Schritt besteht darin die primäre Aminosäuresequenz in die bekannten Proteindomänen zu unterteilen.

A Primärsequenz des S-Proteins von MHV-A59

```

MLFVFILFLP SCLGYIGDFR CIQLVNSNGA NVSAPSISTE TVEVSQGLGT 50
YYVLDRVYLN ATLLLTGYYP VDGSKFRNLA LRGTNSVSL S WFQPPYLNQF 100
NDGIFAKVQN LKTSTPFGAT AYFFTIVIGS LFGYTSYTVV IEPYNGVIMA 150
SVCQYTICQL PYTDCKPNTN GNKLIGFWHT DVKPFICVLK RNFTLNVNAD 200
AFYHFHYQH GTFYAYYADK PSATTFLFSV YIGDILTQYY VLPFICNPTA 250
GSTFAPRYWV TPLVKRQYLE NFNQKGVITS AVDCASSYTS EIKCKTQSM L 300
PSTGVYELSG YTVQPVGVVY RRVANLPACN IEEWLTARSV PSPLNWERKT 350
FQNCNENLSS LLRYVQAESL FCNNIDASKV YGRCFGSISV DKFAVPSRQ 400
VDLQLGNSGF LQTANYKIDT AATSCQLHYT LPKNNVTINN HNPSSWNRRY 450
GFNDAGVFGK NQHDVVYAQQ CFTVRSSYCP CAQPDIVSPC TTQTKEKSAF 500
VNVGDHCEGL GVLEDNCGNA DPHKGCICAN NSFIGWSHDT CLVNDRCQIF 550
ANILLNGINS GTTCSTDLQL PNTEVVTGIC VKYDLYGITG QGVFKEVKAD 600
YYNSWQTLTY DVNGNLNGFR DLTTNKTYTI RSCYSGRVSA AFHKDAPEPA 650
LLYRNINCSY VFSNNISREE NPLNYFDSYL GCVVNADNRT DEALPNCCLR 700
MGAGLCVDYS KSRRAHRSVS TGYRLTTFEP YTPMLVNDVS QSV DGLYEMQ 750
IPTNFTIGHH EEFIQTRSPK VTIDCAAFVC GDNTACRQQL VEYGSFCVNV 800
NAILNEVNNL LDNMQLQVAS ALMQGVTISS RLPDGISGPI DDINFSPLLG 850
CIGSTCAEDG NGPSAIRGRS AIEDLLFDKV KLSDVGFVEA YNNCTGGQEV 900
RDLLCVQSFN GIKVLPPVLS ESQISGYTTG ATAAAMFPFW SAAAGVFFSL 950
SVQYRINLGL VTMNVLSENQ KMIASAFNNA LGAIQDGFDA TNSALGKIQS 1000
VVNANAELNL NLLNQLSNRF GAISASLQEI LTRLEAVEAK AQIDRLINGR 1050
LTALNAYISK QLSDSSTLIKV SAAQAEIKVN ECVKSQTTRI NFGNGNHIL 1100
SLVQNAPYGL YFIHFSYVPI SFTTANVSPG LCISGDRGLA PKAGYFVQDD 1150
GEWKFTGSSY YYPSPITDKN SVMSSCAVN YTKAFEVFLN TSIPNFPDEF 1200
EELDKWFKNQ TSIAPDLSLD FEKLNVTLLD LTYEMNRIQD AIKKLNESYI 1250
NLKEVGTIEM YVKWFTYWL LIGLAQAVG VLLFECST GSGSFKK 1300
GNDEYGGH QDSIVIHNIS SHED 1324

```

B Lineares Schema des S-Proteins



Abbildung 29: Primäre Aminosäuresequenz und lineares Schema des S-Proteins von MHV-A59. (A) Sequenz des S-Proteins von MHV-A59 im FASTA-Format. Das S-Protein besitzt eine Länge von 1324 Aminosäuren (AS). Das Signalpeptid befindet sich am N-Terminus der S1-Domäne. S1 (AS 17–717 - fett) und S2 (AS 718 – 1324) Untereinheiten bleiben während der Fusion nicht-kovalent assoziiert. Im Bereich der AS 713 – 717 liegt die mögliche Trypsinspaltungsstelle mit der Sequenz RRAHR (blau). Weiter C-terminal liegt die Transmembrandomäne, die aus 20 Aminosäureresten besteht. Der cytoplasmatische C-terminale Teil umfasst 38 AS und beinhaltet zahlreiche Cysteinreste (grün). (B) Schematische lineare Darstellung des S-Proteins von MHV-A59 (modifiziert nach Xu et al. [159]). Die HR-Regionen: HR1 (AS 947-1082) und HR2 (AS 1214-1261) befinden sich in der S2-Untereinheit des Proteins. SP – Signalpeptid, TM – Transmembrandomäne.

Für die Analyse struktureller und sequenzspezifischer Kriterien zur Auffindung der möglicher Fusionspeptidkandidaten wird zunächst die Primärsequenz des S-Proteins von MHV-A59 #P11224 aus der SwissProtDatabase (<http://www.expasy.org/uniprot/P11224>) analysiert (Abbildung 29 A).

Die Sequenzanalyse eines Proteins auf Ebene der Aminosäuresequenz ermöglicht die Auffindung einzelner Motive, die für bestimmte Proteinfunktionen wichtig sind. Das S-Protein der Coronaviren

ist das größte bekannte virale Fusionsprotein der Klasse I mit einem Molekulargewicht von 150 – 180 kDa. Es ist an zahlreichen extrazellulären Asparagin (Asn)-Resten glykosyliert und kann weitere Modifikationen wie Myristylierungen und Palmitoylierungen aufweisen.

Tabelle 20: Domänenstruktur des S-Proteins von MHV-A59.

Domäne	Aminosäure	Gesamtlänge (AS)	Beschreibung
Signal	1-16	16	Signalpeptid (SP)
S	17-1324	1308	E2/S Glykoprotein
S1	17-717	701	S1
S2	718-1324	607	S2
Extravirale Domäne	17-1265	1249	Extraviral
HR1	947-1082	137	Heptad Repeat 1
HR2	1214-1261	49	Heptad Repeat 2
Transmembrandomäne	1266-1286	21	TM
Cytoplasmatische (intravirale) Domäne	1287-1324	38	C-terminale (intravirale) Domäne
Cysteinreiche Domäne	1287-1304	18	Cys-Domäne

Die primäre Aminosäuresequenz des viralen Glykoproteins lässt sich in zwei Hauptdomänen gliedern. Die N-terminale S1-Domäne (AS 17-717) und die C-terminale S2-Domäne (AS 718-1324) (Abbildung 29 A und B, Tabelle 20). Das Signalpeptid besitzt eine Länge von 16 AS und befindet sich am N-Terminus des Proteins (Abbildung 29 A und B, Tabelle 20). Die Grenze zwischen S1- und S2-Untereinheit bildet die putative Trypsinspaltungsstelle mit der hoch konservierten Sequenz *RRHR* (AS 713-717). Besondere Merkmale von Fusionsproteinen sind außerdem die HR-Sequenzen (siehe Einleitung). In einem Fusionsprotein kommen zwei dieser Regionen, HR1 und HR2, vor (Tabelle 20). Für die Fusion von Coronaviren ist die Cysteinreiche Domäne des C-terminalen intraviralen Proteinbereiches nicht essentiell, kann den Fusionsprozess allerdings positiv beeinflussen [204, , 205] .

D.7.2 Analyse der Aminosäuresequenz des S-Proteins von MHV-A59

D.7.2.1 Hydrophobizitätsplots des S-Proteins von MHV-A59

Die Aminosäurekomposition bestimmt die Eigenschaften einer Proteinsequenz. Zur Analyse und Identifizierung fusionsaktiver Bereiche eines Proteins wurde zunächst ein Hydrophobizitätsplot des S-Proteins von MHV-A59 erstellt. Dieser dient zur Ermittlung hydrophober Proteinbereiche. Die Erstellung der Hydrophobizitätsplots basiert auf der Hydrophobizitätsskala einzelner Aminosäurereste nach Wimley und White (WWIH-Skala) und sagt aus, welche Energiebarriere (ΔG (kcal/mol)) überwunden werden muss, um einen Aminosäurerest von der wässrigen Phase in

die Lipidphase zu überführen [181] (siehe Material und Methoden). Hydrophile Reste besitzen einen negativen ΔG -Wert, wogegen hydrophobe Reste einen positiven ΔG -Wert aufweisen. Die durchschnittlichen Hydrophobizitätswerte von 19 Aminosäuren werden unter Nutzung der WWIH-Skala herangezogen, um die entsprechenden Hydrophobizitätsplots zu generieren. Diese werden mit der Software – MPex - [196] erstellt und ausgewertet (Abbildung 30).

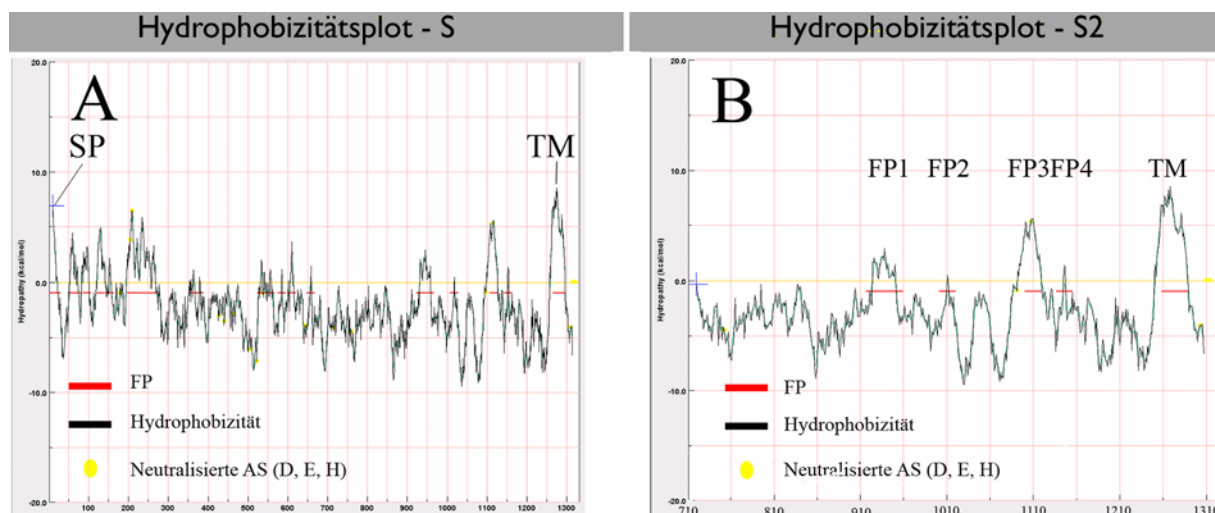


Abbildung 30: Hydrophobizitätsplots des S-Proteins von MHV-A59. (A) Hydrophobizitätsplot des S-Proteins von MHV-A59. Am N-Terminus der Proteinsequenz befindet sich eine hydrophobe Region, das Signalpeptid aus 16 AS. Die Transmembrandomäne befindet sich am C-Terminus. (B) Hydrophobizitätsplot der S2-Domäne von MHV-A59. Die S2-Untereinheit des S-Proteins weist vier mögliche Fusionspeptidkandidaten (FP1 – FP4) auf. TM – rot; Hydrophobizität – schwarz; neutralisierte AS-Reste: D (Asp), E (Glu), H (His); FP – Fusionspeptid.

Nach Erstellung der Hydrophobizitätsplots der Vollängenvariante und der S2-Untereinheit des S-Proteins von MHV-A59 finden sich einige der bereits beschriebenen Charakteristika wieder. Am N-Terminus befindet sich die hydrophobe Signalpeptidsequenz und am C-Terminus die Transmembrandomäne (Abbildung 30 A). Da vermutet wird, dass das Fusionspeptid im Bereich der S2-Untereinheit zu finden ist, wurde zusätzlich ein Hydrophobizitätsplot dieser Sequenz erstellt (Abbildung 30 B). Der Hydrophobizitätsplot für die S2-Region des Proteins zeigt vier mögliche Fusionspeptidkandidaten. Diese werden nach Lage bezüglich des N-Terminus wie folgt durchnummeriert (FP1-4): FP1 liegt am nächsten zum N-Terminus und FP4 am weitesten davon entfernt (Tabelle 21). Es wird angenommen, dass es sich beim Fusionspeptid von MHV-A59 um ein internes Fusionspeptid handelt, was durch den Hydrophobizitätsplot dieser Sequenz bestätigt werden konnte, da keine hydrophobe Region in der Nähe des N-Terminus von S2 identifiziert werden konnte. Die Transmembrandomäne zeigt im Vergleich zu den Fusionspeptidkandidaten den höchsten ΔG -Wert mit 9.9 kcal/mol (Abbildung 30 B). FP1 und FP3 weisen die höchsten ΔG -Werte von 2.86 kcal/mol und 5.56 kcal/mol auf, wogegen die Werte von FP2 und FP4 mit 0.43 kcal/mol und 1.32 kcal/mol eher niedrig ausfallen (Tabelle 21). Die Eingrenzung der vier

Fusionspeptidkandidaten erfolgt anhand der Kriterien für Fusionspeptide (siehe Einleitung). Das in der MPex-Software enthaltene Tool „Totalizer“ ermöglicht außerdem die Berechnung des ΔG -Wertes einzelner Sequenzen.

Tabelle 21: Fusionspeptidkandidaten von MHV-A59.

Fusionspeptid	AS	Sequenz	Länge	ΔG (kcal/mol)
FP1 (Gesamt)	924 - 966	ISGYTTGATAAAMFPPWSAAAGVPFSLSVQYRINGLGVTMNVL	43	2.86
FP1-1	933-960	AAAMFPPWSAAAGVPFSLSVQYRINGL	27	1.98
FP1-2	937-956	FPPWSAAAGVPFSLSVQYR	19	1.82
FP2	1009 - 1027	LNNLLNQLSNRFGAISASL	19	0.43
FP3-1	1108 -1126	YGLYFIHFSYVPISFTTAN	19	5.56
FP3-2	1109-1130	GLYFIHFSYVPISFTTANVSPG	22	3.96
FP4	1144-1162	GYFVQDDGEWKFTGSSYYY	19	1.32
GP2 (EboV)	524-539	GAAIGLAWIPYFGPAA	16	3.32
gp41 (HIV)	512-527	AVGIGALFLGFLGAAG	16	3.45

Ausgehend von den vier vorhergesagten Proteinsegmenten (FP1-4) werden die Eigenschaften mit den bereits identifizierten Fusionspeptiden anderer umhüllter Viren abgeglichen. Die Sequenzen des GP2-Proteins des Ebolavirus und des gp41 des HIV-1 dienen als Referenz. Sie werden nach den beschriebenen Kriterien abgeglichen (siehe Einleitung) [102, , 104, , 106, , 115, , 116, , 119, , 206, , 207, , 208] . Aufgrund der Länge kommen für FP1 und FP3 jeweils 2 Sequenzen in Frage (Tabelle 21). FP1 und FP3 sowie Varianten davon zeigen im Hydrophobizitätsplot und dessen Vergleich mit den bereits identifizierten Fusionspeptiden von HIV-1 und EboV die größten Übereinstimmungen (Tabelle 21 und Abbildung 31). Die erste Region (FP1-1) liegt über 200 Reste C-terminal von der Trypsinspaltungsstelle (AS 713 *RAHR* 717) entfernt, kurz vor der HR1-Region (AS 947-1082), beinhaltet die Reste 933-960 und weist einen ΔG -Wert von 1.98 kcal/mol auf (Tabelle 21, Abbildung 31 C). Eine kürzere Variante dieser Sequenz, FP1-2, liegt etwas C-terminaler, besteht aus den Aminosäureresten 937-956 und weist einen ΔG -Wert von 1.83 kcal/mol auf (Tabelle 21, Abbildung 31 C). FP3 liegt C-terminal zu FP1, erstreckt sich über die Reste 1108-1126 und weist einen ΔG -Wert von 5.56 kcal/mol auf (Tabelle 21 und Abbildung 31 D). FP3-2 hat eine Länge von 22 AS und besitzt einen ΔG -Wert von 3.96 kcal/mol. Die möglichen Fusionspeptide FP1, FP3 und ihre Varianten gehören zur Kategorie der internen Fusionspeptide, wie sie im GP2 von EboV [102] und dem TM-Protein von ASLV [103] vorkommen. Interne Fusionspeptide liegen weit entfernt von der möglichen proteolytischen Spaltungsstelle des viralen Glykoproteins.

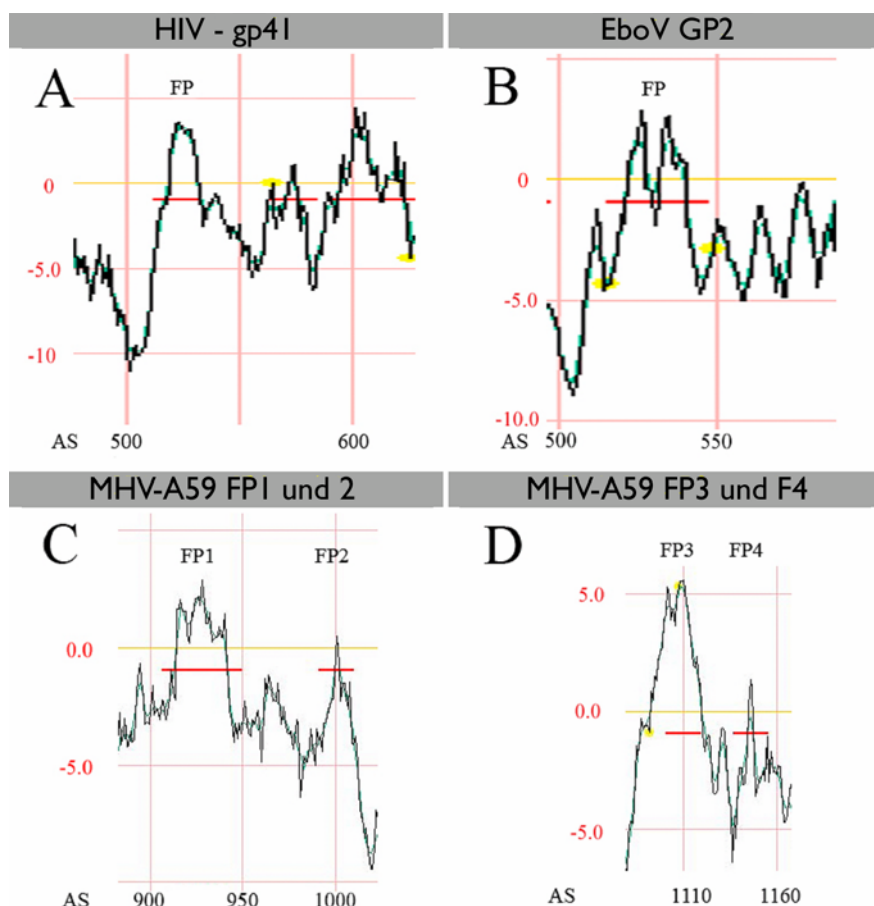


Abbildung 31: Hydrophobizitätsplots der Sequenzen des gp41 von HIV-1, des GP2 von EboV und der FP1-4 von MHV-A59. Die Hydrophobizitätsplots der Glykoproteine von (A) HIV-1 gp41, (B) EboV GP2, (C) der S2-Untereinheit von MHV-A59 FP1 und FP2 und (D) FP3 und FP4. Die roten Balken markieren sowohl die Lage der Fusionspeptide der bekannten Fusionsproteine gp41 und GP2 als auch der Fusionspeptidkandidaten der S2-Domäne von MHV-A59. GP – Glykoprotein.

Die Sequenzanalyse der Fusionspeptidkandidaten und ihrer Varianten offenbart eine Anzahl konservierter Eigenschaften. Alle vier Sequenzen (FP1-1 und -2, FP3-1 und -2) sind kurz, bestehen aus höchstens 27 Aminosäureresten und enthalten vorwiegend hydrophobe Aminosäurereste wie Alanin (A), Glycin (G) und Phenylalanin (F). Ein weiteres typisches Merkmal für interne Fusionspeptide ist der Prolinrest (P) im oder nahe des Zentrums der Peptidsequenz [116, , 117, , 118, , 119]. Die zentralen Prolinreste (P) von FP1 und FP3 liegen jeweils höchstens 2 AS von der zentralen Aminosäure entfernt (Tabelle 21).

D.7.3 Die Lage der möglichen Fusionspeptide im S-Protein von MHV-A59

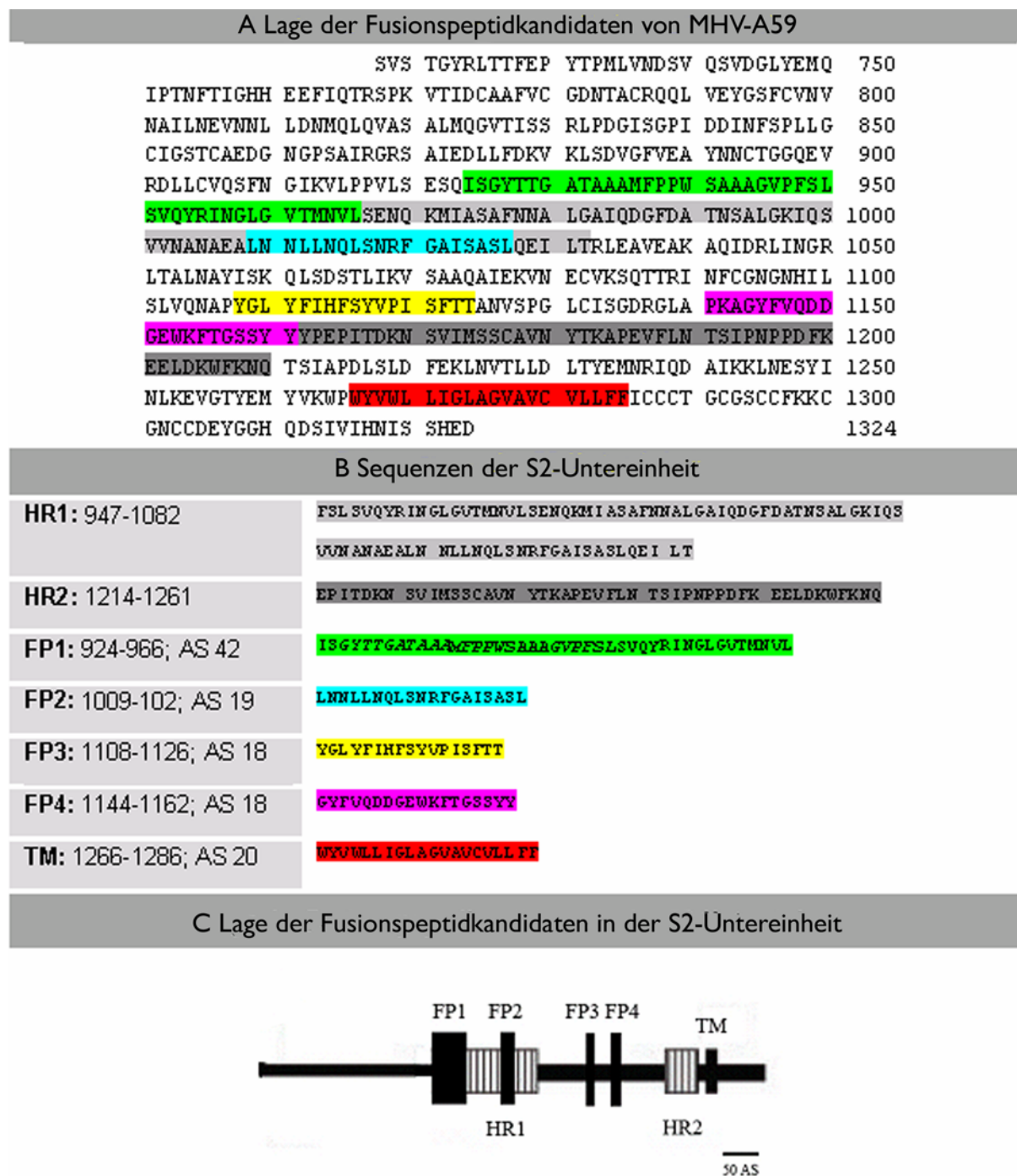


Abbildung 32: Lokalisierung der möglichen Fusionspeptide im S-Protein von MHV-A59. (A) Primäre Aminosäuresequenz der S2-Untereinheit (AS 717-1324). Im Bereich der AS 947-1082 liegt die HR1-Region (hellgrau). Die HR2-Region liegt im Bereich der AS 1214-1261 (dunkelgrau). Die möglichen Fusionspeptide FP1-4 sind farblich unterlegt. Die Transmembrandomäne (TM (AS 1266-1286 rot)) liegt C-terminal. (B) Lineares Schema der S2-Untereinheit (modifiziert nach Xu et al. [159]). Maßstabsgetreue Darstellung der Lage der Fusionspeptide (FP1-FP4). Lage der HR1-, HR2- und TM-Region. HR-Heptad-Repaet, TM – Transmembrandomäne. Balken: 50 AS.

Die für die Fusion essentiellen Strukturen liegen in der S2-Untereinheit des S-Proteins. Die HR1-Region liegt C-terminal der proteolytischen Spaltungsstelle und befindet sich zentral in der S2-

Untereinheit, etwas weiter C-terminal befindet sich die zweite HR-Region - HR2 - N-terminal zur Transmembrandomäne (Abbildung 32 A und C).

Die vier Fusionspeptidkandidaten (FP1-4) wurden in der S2-Sequenz farbig unterlegt (Abbildung 32 A) und sind im linearen Schema als schwarze Balken dargestellt (Abbildung 32 C). Nach den Lokalisierungsstudien innerhalb der Primärsequenz der S2-Untereinheit konnten zwei geeignete Fusionspeptidkandidaten - FP1-1 und FP1-2 - identifiziert werden (Abbildung 33).

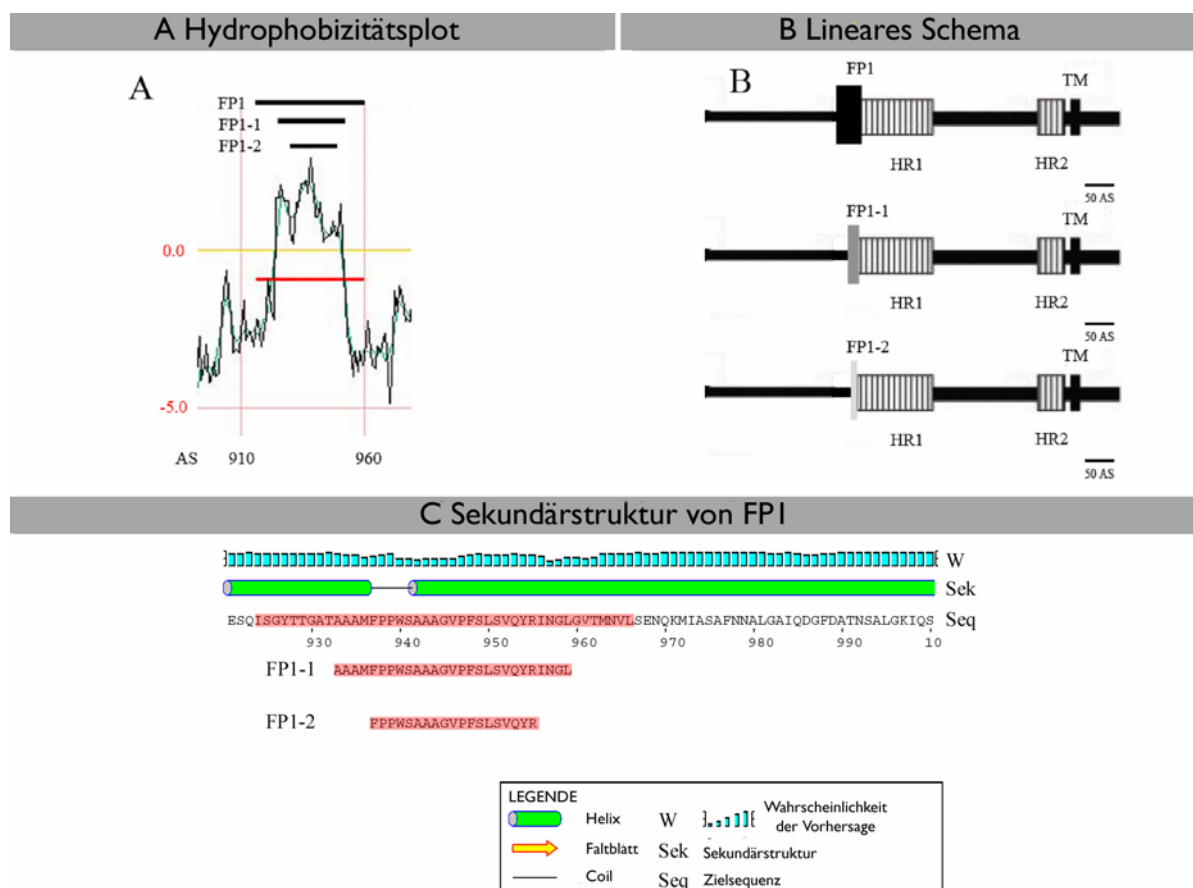


Abbildung 33: Die Fusionspeptidkandidaten FP1-1 und FP1-2. (A) Hydrophobizitätsplot des FP1 Fusionspeptids und der daraus resultierenden Varianten: FP1-1 und FP1-2. (B) Lineares Schema der S2-Untereinheit. Lage der Fusionspeptide in der S2-Untereinheit. (C) Sekundärstruktur von FP1 (rot).

FP1-1 und FP1-2 (Abbildung 33, Tabelle 21) befinden sich N-terminal zur HR1-Region, weisen einen ΔG -Wert von 2 kcal/mol auf und stimmen mit der Mehrheit der bereits beschriebenen Kriterien für interne Fusionspeptide überein. Ein zentrales Prolin in beiden Sequenzen könnte mit der Zielfmembran interagieren. FP1-1 und FP1-2 befinden sich mindestens 200 AS weit entfernt von der proteolytischen Spaltungsstelle (RRAHR), was sie als interne Fusionspeptide prädestiniert. Für interne Fusionspeptide von viralen Fusionsproteinen der Klasse I ist bekannt, dass sie präferentiell α -helikale Sekundärstrukturen ausbilden [62]. Nach Analyse der möglichen Sekundärstrukturen konnte ermittelt werden, dass FP1-1 und FP1-2 α -Helices ausbilden und

einen Helixgrad von über 80% aufweisen (Abbildung 33 C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FP1-1 und FP1-2 besonders geeignet erscheinen als mögliche Fusionspeptide zu fungieren. Sie erfüllen die wichtigsten Kriterien interner Fusionspeptide.

E. Diskussion

Die wesentlichen in der Diskussion zu erörternden Ergebnisse sind nachfolgend kurz zusammengefasst: Der Eintritt von MHV-A59 ist Cholesterol-abhängig. Dies deutet gegebenenfalls auf eine Beteiligung von Cholesterol-reichen Domänen/Rafts bei der Aufnahme der Viren hin. Die Infektivität von MHV-A59 wird durch lysosomotrope Substanzen und Inhibitoren des Clathrin-abhängigen Endozytoseweges gehemmt. Nach Inkubation der Viren mit den Zielzellen findet man MHV-A59 in zellulären Organellen, vermutlich Endosomen, vor. Die Fusion der viralen Membran von MHV-A59 mit der Membran der Zielzelle kann durch Erniedrigung des pH-Wertes ausgelöst werden. Die proteolytische Spaltung des S-Proteins durch endosomale Proteasen der Wirtszelle ist für die Infektivität von MHV-A59 nicht erforderlich, da während der Reifung des Virus in der Wirtszelle das Protein bereits gespalten wird. Die Inkubation von MHV-A59 bei niedrigem pH-Wert löst eine irreversible Konformationsumwandlung im S-Protein aus, die einen Verlust der Infektivität und Fusionsaktivität zur Folge hat. Ein niedriger pH-Wert ist demzufolge ausreichend, um die Konformationsänderung im S-Protein von MHV-A59 auszulösen.

Das S-Protein von MHV-A59 bildet charakteristische peplomere Strukturen auf der Oberfläche von Viruspartikeln aus. Die vorläufige 3D-Rekonstruktion des Proteins ermöglicht die Gliederung in Kopf- und Stammregion. Drei ausgeprägte „Flügel“ dominieren den prägnanten Kopf und sind prädestiniert für die Rezeptorbindung. Das 25 Aminosäuren lange Fusionspeptid FP-1 mit der Primärsequenz 924-ISGYTTGATAAAMFPP-WSAAAGVPFSLSVQYRINGL-959 beinhaltet vermutlich das Fusionspeptid von MHV-A59. Es befindet sich 200 Aminosäurereste entfernt von der mutmaßlichen Trypsinspaltungsstelle in der Nähe der HR1-Region, bildet voraussichtlich α -helikale Sekundärstrukturen aus und besitzt einen für interne Fusionspeptide charakteristischen zentralen Prolinrest.

Das S-Protein von SARS-CoV wird als Trimer exprimiert. Die Fusionsaktivität des S-Proteins von SARS-CoV wird bestimmt durch: (1) S-ACE2-Rezeptor-Interaktion, (2) die proteolytische Spaltung in S1- und S2- Untereinheit und (3) einen niedrigen pH-Wert, vermutlich bereitgestellt durch ein zelluläres Organell. Unklar bleibt die Rolle des niedrigen pH-Werts bei der Auslösung der Fusionsreaktion.

E.1 Identifizierung des Infektionsweges von Coronaviren

Die erste elektronenmikroskopische Charakterisierung des Infektionsweges von MHV-A59 in einer Mauszelle wurde von David-Ferreira und Kollegen 1965 durchgeführt [209]. Die Virusbindung schien eine Invagination der Plasmamembran zur Folge zu haben. Eine Stunde nach Inokulation fanden sie die Viren in intrazellulären Organellen nahe der Plasmamembran vor. Dies war der erste Hinweis auf die Nutzung intrazellulärer Organellen für die Aufnahme und den nachfolgenden Transport der Viren in das Zellinnere. Zwei bis drei Stunden nach Infektion wurden die Partikel in elektronendichteren zellulären Organellen vorgefunden. Die Viruspartikel waren häufig noch intakt, teilweise aber ohne virale Hüllmembran, was eine vorangegangene Fusion vermuten lässt.

Für die Identifizierung und Charakterisierung des Eintrittsweges des Coronavirus MHV-A59 in Mauszellen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unabhängige experimentelle Ansätze verfolgt. Zur Untersuchung der Infektion verschiedener Mauszelllinien durch MHV-A59 wurde zunächst der Plaqueassay durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des viralen Eintritts und die anschließende Analyse der Fusion mit der Zielmembran ermöglichte einen detaillierten Blick auf die ersten Schritte der viralen Infektion durch MHV-A59. Beide Ansätze kommen zu vergleichbaren Ergebnissen. Die Infektion durch MHV-A59 ist empfindlich gegenüber Substanzen, die mit der Endozytose und der endozytotischen Aufnahme sowie dem Transport von Viren zu sauren intrazellulären Kompartimenten interferierten. Eine Umgebung mit niedrigem pH-Wert löst die Fusion von MHV-A59 mit der Membran der Zielzelle direkt aus. Dies konnte durch die Beobachtung einer schnellen Fusion von MHV-A59 mit der Plasmamembran von 17Cl-1 Zielzellen nach Erniedrigung des pH-Werts gezeigt werden. Die Hemmung des Fusionspotenzials durch Vorinkubation der Virionen bei pH 5.0 in Abwesenheit der Zielmembran und die elektronenmikroskopische Aufnahmen von Viren, die einem niedrigen pH-Puls ausgesetzt wurden, lassen vermuten, dass eine irreversible Konformationsumwandlung im S-Protein von MHV-A59 die Fusion zwischen viraler Hüll- und Zielmembran auslöst.

Alle verwendeten lysosomotropen Substanzen - Ammoniumchlorid, Monensin, Bafilomycin und Concanamycin - unterdrücken die Infektion von 17Cl-1, LR-7 und DBT Zellen durch MHV-A59 nahezu vollständig. Bafilomycin A1 könnte auf zwei Arten mit der endozytotischen Route interferieren. Einerseits verhindert es die Ansäuerung endosomaler/lysosomaler Organellen durch Blockierung der vakuolären V-Typ-ATPase. Andererseits inhibiert es den Transport von frühen zu späten Endosomen [38, , 158]. Einen direkten Beweis für die Relevanz der endozytotischen Aufnahme von MHV-A59 in die Zielzelle liefert die Inhibierung der Infektion durch Chlorpromazin. Diese kationische amphiphile Substanz verhindert die Bildung Clathrin-haltiger Vesikel, indem sie die Bindung des Adapterproteins AP-2 an die Plasmamembran hemmt [47]. Auf diese Weise kommt die gesamte Clathrin-abhängige Endozytose der Zelle zum Erliegen [38, , 44, , 45, , 46]. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass MHV-A59 die Zelle über einen Clathrin-

abhängigen Weg infiziert (Abbildung 34). Die Sensitivität der MHV-A59 Infektion gegenüber lysosomotropen Agenzien steht in Übereinstimmung mit einem solchen Eintrittsweg, da Clathrin-haltige Vesikel ihren Inhalt meist an Endosomen liefern, die ein saures Milieu aufweisen. Zusätzlich wird der Befund der endozytotischen Aufnahme dadurch gestützt, dass eine Unterdrückung der Infektion von MHV-A59 nach Cholesterolverarmung zu beobachten ist. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Clathrin-abhängige Endozytose durch den Entzug von Cholesterol nach Behandlung mit M β CD stark inhibiert ist [61, , 201] .

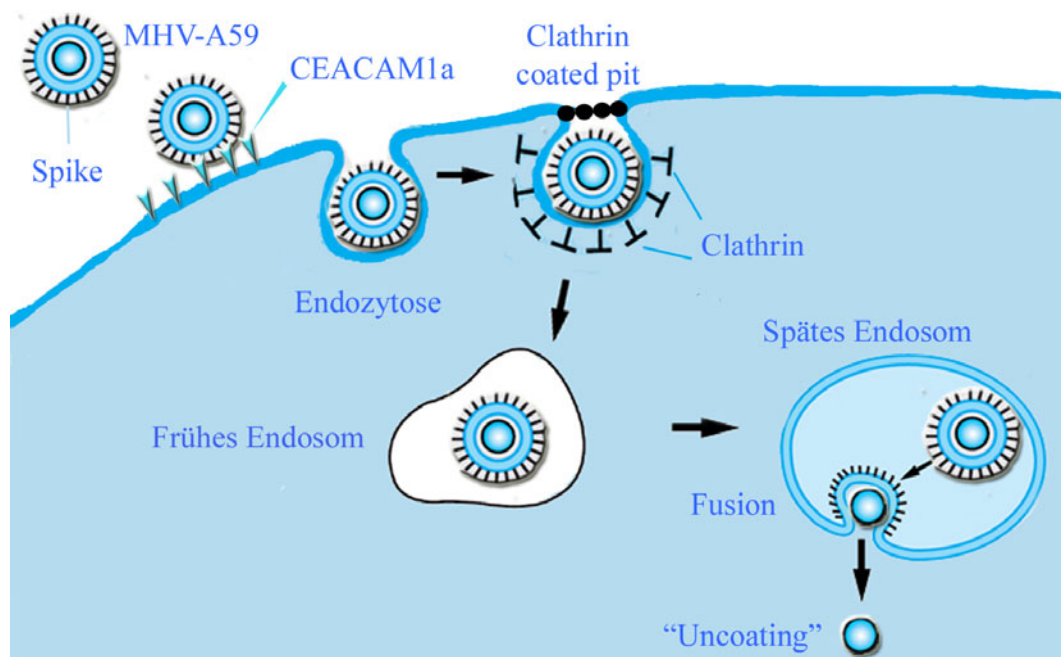


Abbildung 34: Modell des Infektionsweges von MHV-A59. Nach Bindung des Virus an den Rezeptor CEACAM1a erfolgt die endozytotische Aufnahme. Clathrin assembliert um das endozytotische Vesikel und es kommt zu dessen Abschnürung. Die virusbeladenen Vesikel werden zu frühen Endosomen transportiert und reifen dann weiter zu späten Endosomen. Ausgelöst durch einen niedrigen pH-Wert (pH 5.5 – 5.0) wird das virale Nukleokapsid in das Cytoplasma der Zelle entlassen und die eigentliche Fusion von viraler und zellulärer Membran erfolgt („Uncoating“).

Die Annahme, dass ein endozytotisches Kompartiment eine Rolle bei der Infektion von MHV-A59 spielt, steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Rottier und Mitarbeitern [152] . Sie fanden heraus, dass die Infektion von LR-7 Zellen mit MHV-A59 mit bereits gespaltenem S-Protein empfindlich auf die anschließende Behandlung der Zellen mit Chlorpromazin und Bafilomycin A1 reagierte. Der beobachtete Einfluss von Bafilomycin A1 war jedoch weniger ausgeprägt als in den vorliegenden Experimenten, wogegen ein eindeutiger inhibitorischer Effekt von Chlorpromazin nachgewiesen werden konnte. Dies könnte daran liegen, dass in der beschriebenen Arbeit eine niedrigere Konzentration an Bafilomycin A1 (50 nM) verwendet wurde. Eine weitere Studie dagegen steht im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen. Mitarbeiter

um Weiss et al. konnten keinen Einfluss auf die Infektion von L2 Fibroblastenzellen nach Infektion mit einer rekombinanten Variante von MHV-A59 (RA59) beobachten [210]. Weder in Anwesenheit von Bafilomycin A1 noch in der von Ammoniumchlorid wurde die Infektion signifikant unterdrückt [5]. Für die Diskrepanz dieser Ergebnisse könnte es mehrere Gründe geben. Wie kürzlich gezeigt werden konnte [152], hängt der Eintrittsweg von MHV im wesentlichen von zwei Faktoren ab: (i) dem Virusstamm und (ii) dem Zelltyp. Einen weiteren kritischen Punkt stellt die (iii) Dauer der Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Substanzen dar. Während in der vorliegenden Arbeit, wie auch in den meisten anderen Untersuchungen mit Coronaviren oder anderen Hüllviren, die lysosomotropen Substanzen die gesamte Inkubationszeit und auch während der Infektion anwesend waren, wurden diese in der Studie von Qiu et al. [5] eine Stunde nach der Infektion entfernt. Ein Teil der rekombinanten Viren könnte demzufolge intakt geblieben sein. Die Wiederherstellung der pH-Bedingungen im endosomalen Kompartiment nach Entfernung der Reagenzien könnte daraufhin eine Reaktivierung des Fusionspotentials des viralen S-Proteins auslösen. Für andere Coronaviren wie MHV-2 [5] und SARS-CoV [6] konnte bereits ein pH-abhängiger Eintrittsweg beschrieben werden. Für diese Viren bleibt jedoch unklar, ob ein niedriger pH-Wert eine direkte Konformationsumwandlung des S-Proteins auslösen kann oder auf indirektem Weg zur Auslösung der Fusionsreaktion führt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die pH-Abhängigkeit der Infektivität von MHV-2 und SARS-CoV auf der proteolytischen Spaltung des viralen Fusionsproteins durch endosomale Proteasen wie Cathepsin L basiert. Diese sind im Lumen später Endosomen und Lysosomen lokalisiert und ermöglichen die Aktivierung des Fusionspotenzials des S-Proteins. Ähnliches wurde bereits für das Ebolavirus gezeigt [4]. Die S-Proteine von MHV-2 und SARS-CoV werden im Gegensatz zu den S-Proteinen anderer Coronaviren während der Partikelreifung in der Wirtszelle nicht in S1- und S2-Untereinheiten gespalten. Daher müssen sie in einem späteren proteolytischen Spaltungsschritt, möglicherweise erst nach dem Eintritt in die Zielzelle, aktiviert werden, um ihre volle Fusionskapazität zu erlangen. Endosomale Proteasen spalten das virale S-Protein im Endosom so, dass es zu Konformationsumwandlungen kommt, welche die Fusion zwischen viraler Hüllmembran und endosomaler Membran vermitteln. In der Tat konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung der Viren mit Trypsin eine proteolytische Aktivierung der Fusionsaktivität des S-Proteins ausgelöst werden kann [5, , 6].

Interessanterweise finden Rottier und seine Mitarbeiter, dass die Empfindlichkeit gegenüber Bafilomycin A1 und Chlorpromazin für MHV-A59 mit ungespaltenem S-Protein gegenüber Viren mit gespaltenem S-Protein erhöht ist [152]. Die erhöhte Sensitivität könnte mit der Inhibierung der Spaltung durch endosomale/lysosomale Proteasen erklärt werden. Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Fusion von MHV-A59 und dessen Infektion nicht oder nur gering von endosomalen Proteasen abhängig ist (siehe Ergebnisse). Dies ist nicht überraschend,

da bekannt ist, dass eine Spaltung des S-Proteins von MHV-A59 in S1- und S2-Untereinheit bereits während der Virusmaturierung stattfindet [151, , 152] . Proteaseinhibitoren, die endosomale Cysteinprotease wie Cathepsin L und B hemmen, zeigen lediglich einen geringen Einfluss auf die Infektion von 17Cl-1 Zellen durch MHV-A59. Dennoch wird eine Erhöhung der Infektionseffizienz durch Zugabe von Trypsin beobachtet [151] . Das Virus MHV-A59 FI mit vollständig ungespaltenem S-Protein zeigt nach Inhibierung der Proteasen einen deutlichen Rückgang der Infektivität (> 90%) (siehe Ergebnisse). Für die erfolgreiche Spaltung des S-Proteins in S1- und S2-Untereinheit ist die Protease Furin oder ein furin-ähnliches Enzym verantwortlich. Furininhibitoren können lediglich die S-Protein induzierte Zell-Zell-Fusion verhindern, haben jedoch keinen Einfluss auf die Virus-Zell-Fusion [152] .

Die fluoreszenzspektrometrischen und –mikroskopischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein endozytotisches Kompartiment (Endosom/Lysosom) mit einem sauren Lumen eine Rolle beim Eintritt von MHV-A59 in die Zelle spielt. Die durchgeführten Experimente liefern Hinweise darauf, dass für die Fusion der viralen Hüllmembran mit der zellulären Membran keine Proteasen oder andere endosomale Faktoren benötigt werden. Die Erniedrigung des pH-Wertes allein ist ausreichend, um die Fusion von MHV-A59 mit 17Cl-1 Zellen zu induzieren. Während bei neutralem pH-Wert keine Fusion detektiert werden konnte, erfolgte eine sehr schnelle Fusion nach Ansäuerung des Suspensionsmediums (siehe Ergebnisse). Der Fusionsprozess war ferner temperaturabhängig, wie dies bereits für andere Hüllviren beschrieben wurde [41, , 195, , 211, , 212] . Bei Raumtemperatur findet unter allen untersuchten pH-Bedingungen eine deutlich langsamere Fusion statt, die in einem wesentlich geringeren Fusionsausmaß mündet. Zudem liefern die fluoreszenzmikroskopischen Daten einen klaren Beweis dafür, dass ein niedriger pH-Wert die Fusionsaktivität von MHV-A59 auslöst. Nach Bindung von MHV-A59 an 17Cl-1 Zellen findet eine schnelle und effiziente Fusion der viralen Hüllmembran mit der Plasmamembran nach Ansäuerung des Mediums bei 37°C statt. Dies entspricht den Verhältnissen, die im Lumen des späten endosomalen Kompartiments herrschen. Im Gegensatz dazu findet keine oder nur geringe Fusion unter neutralen pH-Bedingungen und 37°C statt. Werden die Virus-Zell-Komplexe jedoch länger als > 10 Minuten bei 37°C inkubiert, wird eine intrazelluläre Markierung beobachtet, die durch Inkubation mit lysosomotropen Agenzien erfolgreich inhibiert werden kann (siehe Ergebnisse). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass MHV-A59 den endozytotischen Weg für den Eintritt in die Zelle nutzt und anschließend zu endosomalen Kompartimenten transportiert wird, wo die eigentliche Fusion stattfindet. In weiteren Experimenten konnte ausgeschlossen werden, dass endosomale Proteasen der Wirtszelle für den viralen Eintritt von MHV-A59 und die damit verbundene Auslösung der Fusionsreaktion notwendig sind (siehe Ergebnisse). Die Schlussfolgerungen, dass die Infektion von MHV-A59 über die endozytotische Aufnahme und den anschließenden Transport zu einem endosomalen Kompartiment erfolgt und

ein niedriger pH-Wert die Fusion und Konformationsumwandlung im S-Protein direkt auslösen kann, steht in Übereinstimmung mit den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen eines weiteren Mitglieds der Coronavirusfamilie, dem infektiösen Bronchitisvirus - IBV [213]. Die Infektivität von IBV kann wie bei MHV-A59 durch lysosomotrope Agenzien und Inhibitoren der pH-abhängigen Endozytose blockiert werden, wird aber durch Proteaseinhibitoren nicht beeinflusst. Zusätzlich kann die pH-abhängige Fusion durch den auf R_{18} basierenden Fluoreszenzdequenchingassay nachgewiesen werden. Dieser Weg des zellulären Eintritts scheint, wenn nicht für alle, so doch für einige Mitglieder der Coronavirusfamilie zu gelten.

E.2 Die Struktur des S-Proteins von Coronaviren

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Ansätzen die Struktur des S-Proteins von Coronaviren analysiert und charakterisiert. Im eukaryotischen Zellsystem wurden zunächst verschiedene Varianten des S-Proteins von SARS-CoV exprimiert und aufgereinigt. In einem weiteren Ansatz wurden infektiöse MHV-A59 Virionen gezüchtet und isoliert, um die Struktur des S-Proteins an intakten Viruspartikeln zu untersuchen.

E.2.1 Das S-Protein von SARS-CoV

Das S-Protein von SARS-CoV konnte sowohl in der Vollständigkeitsvariante (S-Full), als auch als verkürzte Ektodomäne (S-Ekto) im eukaryotischen Zellsystem als C-terminal (His)₆-getaggte Variante exprimiert und aufgereinigt werden. Im nativen Proteingel konnte nachgewiesen werden, dass die Ektodomäne als Trimer oder Monomer exprimiert wird. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten Daten von Xiao et al. [173, , 214]. Diese zeigen, dass die Ektodomäne des S-Proteins von SARS-CoV als Trimer mit einem Molekulargewicht (MW) von ca. 512 kDa vorliegt. Ein geringerer Anteil des Proteins wird als Monomer mit einem MW von 200 kDa exprimiert. Interessanterweise kann der N-terminale Anteil des S-Proteins Dimere mit einem Molekulargewicht von ~230 kDa ausbilden [214]. Im Gegensatz zu anderen viralen Fusionsproteinen konnte der native, oligomere Zustand des Proteins ohne Zugabe von Crosslinkern nachgewiesen werden. Dies liegt vermutlich daran, dass ein Großteil der S-Proteine im nativen Zustand ungespalten ist. Im Gegensatz zu anderen S-Proteinen der Coronavirus-Familie, die während ihrer Maturierung in der Wirtszelle proteolytisch in S1- und S2-Untereinheiten gespalten werden [151, , 152, , 215, , 216], ist dies bei SARS-CoV nicht der Fall [156, , 217]. Sowohl durch SDS-PAGE als auch nach Westernblotanalyse konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrheit der exprimierten Fusionsproteine in der ungespaltenen Form (180-200 kDa) vorliegt und ein sehr geringer Teil als gespaltene S1/S2 (90 kDa)-Bande auftritt (siehe Ergebnisse).

Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass S-Monomere in glykosylierter (200 kDa) und nicht-glykosylierter (180 kDa) Form exprimiert werden.

Mit dem Ziel der Aufklärung der 3D-Struktur des S-Proteins wurde das aufgereinigte S-Protein elektronenmikroskopisch analysiert. Die Proteinausbeute, die mit dem verwendeten Expressionssystem erreicht werden konnte, war leider nicht ausreichend, um eine Rekonstitution des viralen Fusionsproteins in Liposomen durchführen zu können. Die angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen vorwiegend Aggregate von Proteinen, die in ihrer Größe nicht den erwarteten hochmolekularen Komplexen (500-600 kDa) entsprechen. Möglicherweise führte die Wechselwirkung der 1%igen Phosphorwolframsäure mit den viralen Proteinen zu deren Degradation. Bemühungen zur Optimierung der Transfektions-, Expressions- und Aufreinigungsbedingungen schlugen weitgehend fehl. Dennoch gelang es nach Analyse einer Präparation der S-Vollängenvariante vereinzelte S-Proteine zu identifizieren, welche in Abmessungen in Übereinstimmung mit der erwarteten Größe stand (siehe Ergebnisse). Zur Analyse der aufgereinigten S-Proteine von SARS-CoV in verschiedenen Orientierungen wurden zusätzlich Ni-Lipidhaltige SUVs hergestellt und mit den entsprechenden (His)₆-Tag Varianten des S-Proteins inkubiert. Es konnte keine Anlagerung oder Ausrichtung der Proteine an die Liposomen beobachtet werden. Lediglich Veränderungen in Form und Gestalt der SUVs wurden erfasst (siehe Ergebnisse).

In zwei kürzlich veröffentlichten Arbeiten konnte die Struktur der SARS-Virionen sowie des viralen S-Proteins charakterisiert werden [165, , 218]. Beniac et al. erstellten eine 3D-Rekonstruktion des S-Proteins. Zusätzlich gelang mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie die Rekonstruktion intakter SARS-CoV Virionen. Die Struktur des S-Protein Trimers konnte mit einer Auflösung von 16 Å rekonstruiert werden. Demnach hat das S-Protein einen Durchmesser von 180 Å und ragt 160 Å aus der Virushülle hervor. Das Protein ist über einen kurzen, dünnen Stamm in der Virusmembran verankert. Die Masse des trimeren S-Proteins beträgt etwa 500 kDa [155, , 214]. Dies ist konsistent mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. Nach biochemischen Studien besitzt ein Virion durchschnittlich 66,7 S-Proteine [167]. Dies konnte anhand der Berechnungen von Beniac et al. bestätigt werden, die eine durchschnittliche Zahl von 65 S-Proteinen pro Viruspartikel beschreiben [165]. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen führten Li et al. ähnliche Analysen an exprimierten rekombinanten S-Proteinen in einem *in vitro* Expressionssystem durch [218]. Sie konnten nachweisen, dass die Ektodomäne des S-Proteins (S-e) vier verschiedenen Konformationszustände einnehmen kann (Abbildung 35 A-D): Es liegt entweder als L-förmiges S-e Monomer (A), als ungespaltenes S-e Trimers (B), als gespaltenes S-e Trimer (C) oder in Form von elongierten S2-Trimer-Rosetten mit dissoziierten S1-Monomeren (D) vor. S-e Monomere besitzen ein Molekulargewicht von 157 kDa und eine Länge von 160 Å. Durch pH-Erniedrigung kommt es zu einer irreversiblen Umlagerung der L-förmigen Struktur des S-Protein Monomers und zur

Ausbildung nelkenförmiger Trimere mit einem MW von 520 kDa (Abbildung 35 A und B) [218] . Nach Trypsinbehandlung der Monomere finden Li et al. zwei Fragmente von 100 kDa und 70 kDa vor, wobei das größere vermutlich der S1- und das kleinere Fragment der S2-Untereinheit entspricht. Das Trimer kann mittels Trypsin gespalten werden, allerdings verbleibt die S2-Untereinheit auch bei hohen Trypsinkonzentrationen ungespalten. Die proteolytische Spaltung des S-Proteins findet an der Grenze zwischen S1- und S2-Untereinheit an der konservierten proteolytische Spaltungsstelle (RRXRR) statt. Dies hat zur Folge, dass die S1-Untereinheiten als lösliche Monomere dissoziieren und die S2-Untereinheiten Rosetten ausbilden können (Abbildung 35 D). Dieser Zustand stellt vermutlich die Situation nach Auslösung der Fusion, den so genannten „Postfusionszustand“, dar. Interaktionsstudien mit löslichem ACE2-Rezeptor und aufgereinigten S-Proteinen zeigen, dass ACE2 sowohl S-e Monomere, als auch S-e Trimere binden kann (Abbildung 35 E). Die Bindung der Trimere findet an der Knopffregion des Proteins statt. Vermutlich beinhaltet diese die Rezeptorbindungsdomäne.

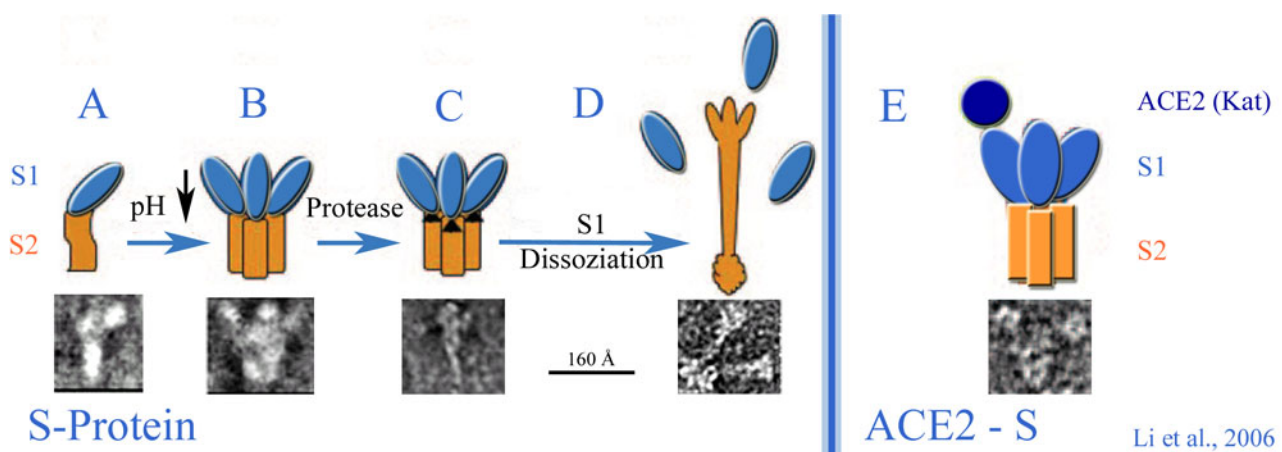


Abbildung 35: Das S-Protein von SARS-CoV [218] . (A-D) Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahmen aufgereinigter S-Proteine. (A) S-e Monomere weisen eine L-förmige Gestalt mit einer Länge von 160 Å auf. (B) Durch pH-Erniedrigung kommt es zur Trimerisierung der S-Proteine, die eine nelkenförmige Konformation einnehmen. (C) Die S-Trimere sind sehr stabil und behalten nach Trypsinspaltung ihre Struktur bei. (D) Nach Inkubation mit 1M Harnstoff bilden gespaltene S-Proteintrimere Rosetten aus. (E) Die Bindung der katalytischen Untereinheit des ACE2-Rezeptors erfolgt sowohl mit S-e Monomeren als auch mit S-e Trimeren.

Die Zusammenlagerung der S2-Untereinheiten zu Rosetten ist vergleichbar mit der Situation der HA2-Untereinheit nach der Fusion. Das Hämagglutinin (HA) des Influenzavirus A, bildet nach pH-Erniedrigung und proteolytischem Abbau der rezeptorbindenden HA1-Domäne ebenfalls Rosetten aus [219] . Ähnliches wird für die S2-Trimere des S-Proteins von SARS-CoV angenommen, da auch diese nach Dissoziation der S1-Untereinheiten Rosetten ausbilden. Im intakten Virus oder Pseudovirus liegen die S-Proteine jedoch bereits als Trimere vor, eine

Trimerisierung ist für den viralen Eintritt also nicht mehr notwendig. Die physiologische Relevanz der pH-induzierten Trimerisierung für den Eintritt in die Zelle bleibt unklar. Die Behandlung mit Trypsin kann die Fusion von S-Protein exprimierenden Zellen bei neutralem pH-Wert zusätzlich unterstützen [6, , 168] . Nach Behandlung mit Trypsin, Thermolysin oder Elastase kann der Eintritt für S-Protein beinhaltende Pseudovirionen trotz Inhibierung mit lysosomotropen Agenzien ermöglicht werden [6, , 220] . Insbesondere im Hinblick auf die Länge des HR1/HR2-Komplexes der S2-Untereinheit weisen die von Li et al. beobachteten S2-Rosetten typische Charakteristika der Postfusionskonformation auf [154] .

E.2.2 Die S-Protein-vermittelte Fusion von SARS-CoV

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zu Fusionsstudien S-Protein exprimierender Zellen stimmen mit den bisher erzielten Daten anderer Gruppen weitgehend überein. Die durch das S-Protein von SARS-CoV vermittelte Fusion ist sowohl abhängig von der (i) Anwesenheit des Rezeptors ACE2, (ii) von einer Umgebung mit niedrigem pH-Wert und der (iii) proteolytischen Spaltung in S1 und S2 durch eine Protease (endosomale Protease) (siehe Ergebnisse). Unklar bleibt die Rolle des pH-Wertes. Zum einen könnte er für die Aktivierung der endosomalen Protease verantwortlich sein, die nur unter niedrigen pH-Bedingungen optimal arbeiten kann. Zum anderen könnte ein niedriger pH-Wert eine direkte Konformationsumwandlung im S-Protein induzieren. Möglich wäre auch eine Kombination aus beidem. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Xiao et al. (S-Protein) [173] und Li et al. (ACE2-Rezeptor) [156] konnte nachgewiesen werden, dass die Vollängenvarianten des S-Proteins und des ACE2-Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen exprimiert werden. In verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte bestätigt werden, dass die Zell-Zell-Fusion nur unter bestimmten Bedingungen ablaufen kann. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hofmann et al. [59] , die eine Abhängigkeit der SARS-CoV Infektivität von einer niedrigen pH-Umgebung nachweisen konnten, indem sie die Ansäuerung zellulärer Organellen mittels Ammoniumchlorid verhinderten, war die Inkubation der Zell-Zell-Komplexe bei niedrigem pH allein nicht ausreichend, um Zell-Zell-Fusion zu induzieren. Erst nach zusätzlicher Inkubation S-Protein exprimierender Zellen mit Trypsin konnte eine erfolgreiche Zell-Zell-Fusion beobachtet werden (siehe Ergebnisse). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Experimenten von Simmons et al. und Yan et al. [6, , 168, , 169] . In weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass S-Protein beinhaltende Pseudoviren nur nach Ansäuerung mit der endosomalen Membran fusionieren [6, , 59] . Dennoch wurde in keiner der vorliegenden Veröffentlichungen bestätigt, dass der Eintrittsweg von SARS-CoV Clathrin-abhängig erfolgt. In nachfolgenden Experimenten dieser und anderer Gruppen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine proteolytische Spaltung des S-Proteins mit Proteasen, wie Cathepsin L, die im endosomalen Kompartiment lokalisiert sind, essentiell ist, um eine Konformationsumwandlung im S-Protein von

SARS-CoV auszulösen, welche zur Fusion von viraler und zellulärer Membran führt [6, , 221] . Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für das Ebolavirus beschrieben [4] . In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Notwendigkeit der proteolytischen Spaltung durch endosomale Proteasen auch ein deutlicher Einfluss des pH-Wertes, unabhängig von der Aktivierung der Proteasen, gefunden. Ein niedriger pH-Wert verstärkt die Zell-Zell-Fusionsreaktion S-Protein und ACE2-Rezeptor exprimierender Zellen zusätzlich (siehe Ergebnisse).

E.3 Das S-Protein von MHV-A59

E.3.1 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59

Neben der Untersuchung des in Zellen exprimierten S-Proteins von SARS-CoV wurden S-Proteine von MHV-A59 an intakten Viruspartikeln untersucht. Soweit bekannt, wurden für MHV-A59 noch keine kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Lediglich elektronenmikroskopische Aufnahmen früherer Arbeiten geben Hinweise auf Form und Orientierung der S-Proteine in der viralen Hüllmembran [197] . Die Viruspartikel konnten in der vorliegenden Arbeit in hochreiner Form isoliert werden und zeigen runde, ovale oder nierenförmige Gestalt (siehe Ergebnisse), wie dies bereits für andere Coronaviren wie SARS-CoV beschrieben wurde [165] . Unter neutralen pH-Bedingungen zeigen die Virionen gut definierte S-Proteine mit einer ungefähren Länge von 20 nm (180-200 Å), die aus einer kurzen Stammregion und einer großen, globulären, triangulären Kopfdomäne bestehen, die distal der Hüllmembran orientiert ist. Die ermittelte Morphologie des S-Proteins steht sowohl mit der von Sturman et al. publizierten [197] als auch mit den neuesten Untersuchungen an SARS-CoV [165, , 218] in Übereinstimmung. Diese Arbeiten zeigen für das gesamte S-Protein ausgehend von der viralen Hüllmembran eine Ausdehnung von 180 Å. Die Struktur besitzt eine kurze Stammdomäne und eine große Kopfdomäne triangulärer Form.

Für eine 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59 mit der Einzelpartikelmethode war es im Verlauf der weiteren Untersuchungen wichtig einzelne, nicht überlappende S-Protein-Partikel zu finden, die sich in vielen unterschiedlichen Raumwinkeln orientierten. Für isolierte Viruspartikel mit zahlreichen S-Proteinen auf der Oberfläche wurden die Untersuchungen zunächst unter neutralen pH-Bedingungen durchgeführt. Auf diese Weise konnten mehr als 2800 Einzelpartikel extrahiert werden, die in 440 Klassensummenbildern zusammengefasst wurden (Abbildung 36). Ausschnitt A der Abbildung 36 zeigt die membranverankerten S-Proteine eines MHV-A59 Viruspartikels (Details siehe Ergebnisse). Für die 3D-Rekonstruktion stellte vor allem das Fehlen von Ansichten von oben, sogenannten „Top Views“, eine Schwierigkeit dar.

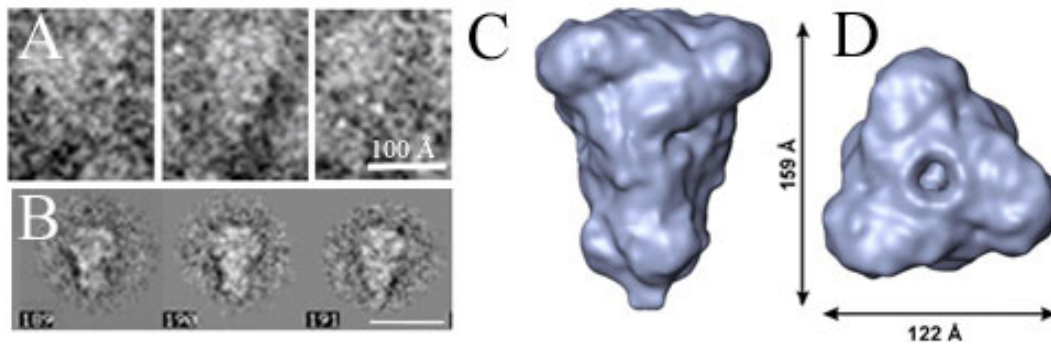


Abbildung 36: Die Struktur des S-Proteins von MHV-A59. (A) Einzelmoleküle der membranverankerten S-Proteine. Balken: 100 Å. (B) Klassensummenbilder 189-191 aus 440 extrahierten Klassensummenbildern des S-Proteins. Balken: 200 Å. (C und D) 3D-Rekonstruktion des S-Proteins in Isosurface-Darstellung als Seitenansicht und „Top-View“.

Dennoch gelang nach Abgleich der Klassensummenbilder die Erstellung einer vorläufigen 3D-Rekonstruktion. Die Hauptstrukturmerkmale des S-Proteins von MHV-A59 sind Kopf- und Halsdomäne (siehe Ergebnisse). Die Kopfdomäne weist drei exponierte „Flügel“ auf und erscheint prädestiniert für die Bindung des Rezeptormoleküls.

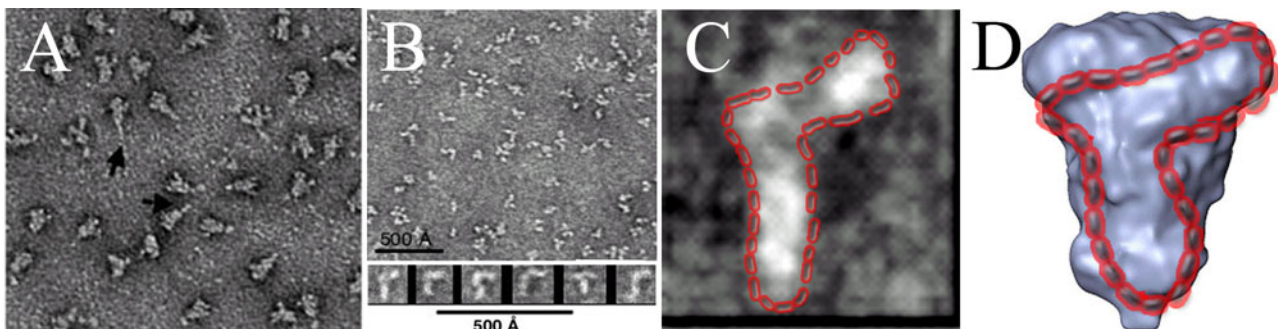


Abbildung 37: Vergleich der Struktur der S-Proteine von SARS-CoV und MHV-A59. (A) Trimere SARS-CoV S-Proteine nach Trypsinspaltung [218]. (B) Monomere der S-Ektodomäne von SARS-CoV [218]. (C) Vergrößerung eines Monomers der S-Ektodomäne. (D) Mögliche Anordnung des S-Monomers von SARS-CoV im 3D-Modell von MHV-A59. Balken: 500 Å.

Ein Vergleich der von Li et al. publizierten Struktur des S-Proteins von SARS-CoV mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten vorläufigen 3D-Struktur des S-Proteins von MHV-A59 zeigt einige Ähnlichkeiten auf (Abbildung 37). Die Trimere, die nach pH-Erniedrigung eine gewürzelnenförmige Struktur aufweisen, entsprechen weniger den ermittelten Klassensummen. Die trypsingespaltene Trimere (S1+S2) von SARS-CoV dagegen sind den S-Proteinen der MHV-A59 Partikel sowohl in deren Dimension (Länge: 160 Å, Breite: 120 Å) als auch deren Struktur auffallend ähnlich (Abbildung 37 A). Dies ist konsistent mit unseren sowie mit bereits publizierten Daten, die zeigen, dass S-Proteine von MHV-A59, die in 17Cl-1 Zellen gezüchtet wurden,

gespalten (S1+S2) vorliegen [151] und für die Auslösung der Fusion und/oder Konformationsänderung keiner proteolytischen Spaltung im Endosomen mehr bedürfen (siehe Ergebnisse). Die Monomere der S-Ektodomäne von SARS-CoV dagegen weisen eine L-förmige Gestalt auf und stimmen erstaunlich gut mit der vorläufige 3D-Rekonstruktion des S-Proteins von MHV-A59 überein (Abbildung 37 B-D). S-Proteinmonomere lagern sich erst nach Einnahme ihrer endgültigen Konformation zu stabilen Trimeren zusammen. Dies findet *in vivo* im Golgi-Apparat statt [222]. Die elongierten Postfusionskonformationen der S2-Untereinheiten, die von Li et al. nach Inkubation mit Harnstoff beobachtet wurden, entsprechen den langen dünnen S-Proteinen, die in der vorliegenden Arbeit nach Inkubation bei pH 5.0 und 37°C beobachtet wurden (siehe Ergebnisse).

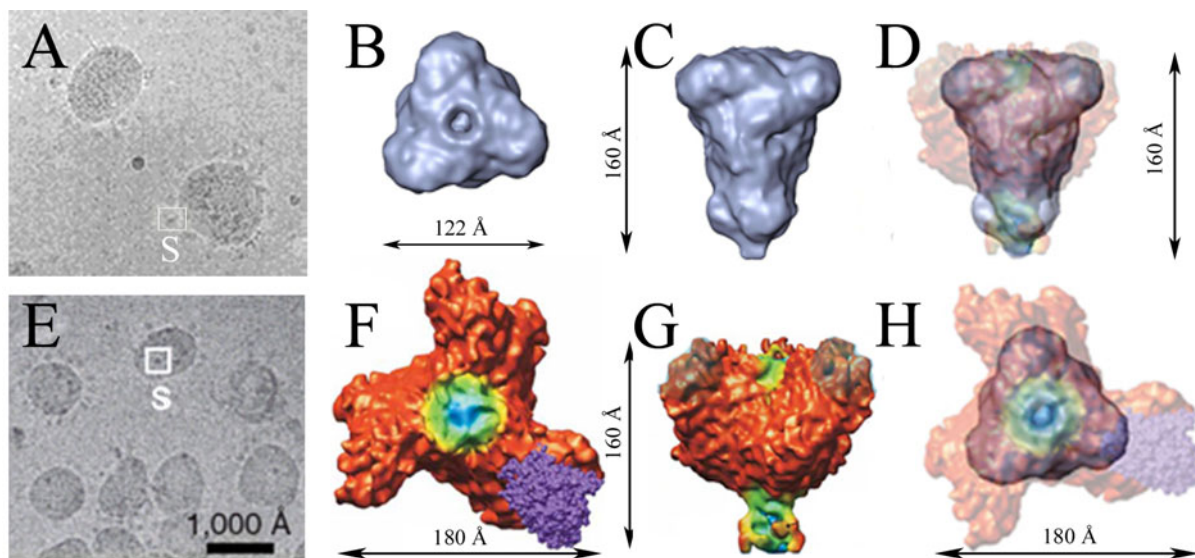


Abbildung 38: Vergleich der 3D-Struktur der S-Proteine von MHV-A59 (A-C) (K. Ludwig) und SARS-CoV (E-G) [165]. (A) Kryo-EM Aufnahme von MHV-A59 (ohne Kontrastmittelzusatz). (B und C) Isosurface-Darstellung des S-Proteins von MHV-A59. (D und H) Überlagerung der S-Proteine von MHV-A59 und SARS-CoV (durchscheinend). (E) Kryo-EM Aufnahme von SARS-CoV. (F und G) Isosurface-Darstellung des S-Proteins von SARS-CoV.

Beniac et al. verfolgten in ihren Untersuchungen einen ähnlichen Ansatz der 3D-Rekonstruktion des S-Proteins für SARS-CoV, wie dies in der vorliegenden Arbeit für das S-Protein von MHV-A59 erfolgte (Abbildung 38). Überraschenderweise kamen sie zu einer gänzlich anderen Struktur (Abbildung 38 F-H). Als mögliche Ursache wurde zunächst die Verwendung des Kontrastmittels Phosphorwolframsäure in Erwägung gezogen, da die Daten von Beniac et al. aus reinen Kryo-TEM-Aufnahmen gewonnen wurden. Die rein kryo-EM Aufnahmen von MHV-A59 ohne Kontrastmittel zeigen allerdings die gleiche Morphologie und Struktur der S-Proteine wie nach Verwendung des Kontrastmittels (Abbildung 38 A). Die Primärsequenzen der S-Proteine von SARS-CoV und MHV-A59 ähneln sich sehr und weisen eine Sequenzhomologie von

über 30% auf. Ein Unterschied findet sich in der Länge der Sequenzen: Das S-Protein von MHV-A59 ist mit 1,324 AS-Resten etwas länger, als das von SARS-CoV mit 1,255 AS-Resten, dies entspricht auch den ermittelten Größenunterschieden des resultierenden Trimers. Ferner liegt das S-Protein von SARS-CoV vermutlich ungespalten vor, wogegen das S-Protein von MHV-A59 nach der Virusmaturierung gespalten ist. Der Spaltungsgrad des S-Proteins von SARS-CoV wird in der Literatur nach wie vor kontrovers diskutiert. Neuesten Studien zufolge wird das S-Protein durch die zelluläre Protease (Xa) in der Wirtszelle posttranslational in S1 und S2 gespalten [223]. Ähnliches wurde bereits von Wu et al. in VeroE6 Zellen nachgewiesen, die mit SARS-CoV infiziert wurden [166]. Frühere Untersuchungen dagegen zeigen, dass das S-Protein von SARS-CoV in der Wirtszelle nicht prozessiert wird [217]. Schließlich konnten Li et al. nachweisen, dass nach Inkubation bei niedrigem pH-Wert eine Trimerisierung der S0-Monomere stattfindet. Diese Struktur weist tatsächlich einen breiteren Kopf auf (Abbildung 39 B), besitzt allerdings nicht die Dimensionen der von Beniac et al. beschriebenen Struktur. Die Köpfe sind stärker voneinander separiert und die Stammdomäne erscheint wesentlich breiter. Möglicherweise wirkt sich das Fehlen der Transmembrandomäne und/oder der intraviralen Domäne auf die Form des S-Proteins aus. Die von Li et al. beschriebenen L-förmigen Monomere und die trypsingespaltene Trimere ähneln teilweise der in dieser Arbeit rekonstruierten 3D-Struktur des S-Proteins von MHV-A59. Dennoch bleibt die Frage bestehen, warum sich die S0-Konformation von Li et al. so stark von der S0-Anordnung von Beniac et al. unterscheidet.

E.3.2 Konformationen des S-Proteins von MHV-A59

Zusätzliche Experimente sollten Aufschluss über die unterschiedlichen Konformationszustände des S-Proteins von MHV-A59 geben. Nach Inkubation bei pH 5.0 und 37°C wurden verschiedene Anordnungen der S-Proteine erfasst, die vermutlich unterschiedlichen Intermediaten der Konformationsstadien entsprechen (siehe Ergebnisse). Die häufigste Form der Konformation des S-Proteins nach pH-Erniedrigung stellen verlängerte, dünne Stämme dar, die keine Kopfdomäne tragen (Abbildung 39 D'). Die Inkubation der Viren bei pH 5.0 führt im S-Protein von MHV-A59 vermutlich zur Dissoziation der S1-Untereinheiten, wie dies von Li et al. für SARS-CoV nach proteolytischer Spaltung und Inkubation mit Harnstoff beschrieben wurde (Abbildung 39 D [218]). Für MHV-A59 ist jedoch bekannt, dass die proteolytische Spaltung der S-Proteine bereits während der Maturierung in der Wirtszelle erfolgt (Abbildung 39 A'-C') [152]. Somit ist unseren Daten zufolge die pH-Erniedrigung allein ausreichend, um die Dissoziation der rezeptorbindenden S1-Untereinheiten zu induzieren (Abbildung 39 D'). Diese Experimente zeigen, dass die Konformationsänderung des S-Proteins tatsächlich durch den pH-Wert beeinflusst werden kann.

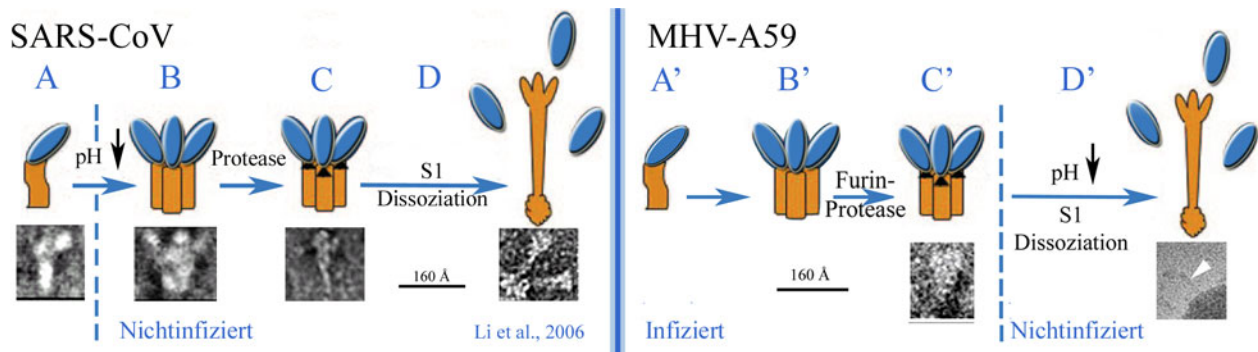


Abbildung 39: Konformationszustände des S-Proteins von SARS-CoV (A-D) [218] und MHV-A59 (A'-D', siehe Ergebnisse).

S-Proteine von MHV-A59, die bei niedrigem pH-Wert inkubiert wurden, erfuhren ferner eine irreversible Konformationsumwandlung, die einen Verlust der Fusionsaktivität und Infektivität zur Folge hatte (siehe Ergebnisse). In vorangegangenen Studien konnte eine Konformationsumwandlung im S-Protein von MHV-A59 nach Erniedrigung des pH-Wertes auf 6.5 und Bindung an den Rezeptor ausgelöst werden [148, , 224, , 225]. Neben der Wechselwirkung des viralen Fusionsproteins mit dem Rezeptor scheint auch ein niedriger pH-Wert eine Rolle bei der Auslösung der Konformationsumwandlung im S-Protein von MHV-A59 zu spielen. In aktuellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der MHV/BHK-Stamm des Virus BHK-Zellen trotz des Fehlens des CEACAM-Rezeptors infizieren kann [226]. Heparansulfat konnte auch für andere Virusspezies als Rezeptor identifiziert werden. Für das humane Rhinovirus Typ 89 (HR89) und das Herpesvirus Typ 8 (HH8) fungiert Heparansulfat ebenfalls als Rezeptor [42, , 227]. Nicht immer ist mit der Bindung des Virus auch eine Internalisierung verbunden. HR89 nutzt Heparansulfat in erster Linie zur Bindung. Für den Eintritt jedoch sind weitere zelluläre Faktoren wichtig [42]. Ähnliches gilt für das Influenzavirus, das HA-Protein bindet Sialinsäurereste auf der Oberfläche der Zielzellen [69]. Neben der Notwendigkeit des Rezeptors für den Eintritt in die Zelle wurde die Anwesenheit weiterer zellulärer Faktoren für MHV in früheren Arbeiten diskutiert [228, , 229]. Bis heute konnte ein solcher Faktor jedoch nicht identifiziert werden. Die irreversible Konformationsumwandlung und der Verlust des Fusionspotentials sind typische Merkmale von Klasse I Fusionsproteinen, unabhängig davon, ob die strukturellen Veränderungen durch Rezeptorbindung (bei neutralem pH) oder durch pH-Erniedrigung (ohne oder mit Rezeptor) ausgelöst werden (siehe Einleitung [62]). Ein gut untersuchtes Beispiel ist das HA-Protein des Influenzavirus A. Es durchläuft eine schnelle, irreversible Konformationsumwandlung bei niedrigem pH und erhöhten Temperaturen [86, , 194]. Bei niedrigen Temperaturen jedoch konnte keine inaktive Postfusionskonformation des HA-Proteins nach pH-Erniedrigung gefunden werden. In diesem Fall blieb die Fusionskapazität des Proteins erhalten [194, , 212]. In der vorliegenden Arbeit konnten für MHV-A59 ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Nach Inkubation der

Viruspartikel bei niedrigen Temperaturen (4°C), bei pH 5.0 und anschließender Neutralisierung war MHV-A59 noch immer in der Lage mit den Zellen zu fusionieren.

E.4 Identifizierung des Fusionspeptids von MHV-A59

Für SARS-CoV wurde das mutmaßliche Fusionspeptid kürzlich von Sainz et al. identifiziert und charakterisiert [108]. Basierend auf den konservierten Eigenschaften bereits bekannter Fusionspeptide und nach Auswertung der Hydrophobizitätsplots der S2-Untereinheit von SARS-CoV, gelang zunächst die Identifizierung von zwei Fusionspeptidkandidaten (SARS_{WW-1} und SARS_{WW-2}). Diese liegen in der Nähe des N-Terminus der S2-Untereinheit und gehören somit zur Klasse der N-terminalen Fusionspeptide. Beide Peptide sind reich an Alanin-, Glycin- und Phenylalaninresten. Ferner besitzen sie ein charakteristisches Tripeptid (YFG/FXG). Nur eines der 19 Aminosäuren langen Peptide - SARS_{WW-1} - war in der Lage Liposomen zur Fusion zu bringen.

Für das Coronavirus MHV-A59 wird ein intern lokalisiertes Fusionspeptid angenommen, welches vermutlich nahe der HR1-Region liegt [176, , 177, , 230]. Bis jetzt konnte für das Coronavirus MHV-A59 jedoch noch kein Fusionspeptid identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Eigenschaften bereits bekannter Fusionspeptide, durch Analyse der Hydrophobizitätsplots und möglicher Sekundärstrukturen versucht, geeignete Fusionspeptidkandidaten zu ermitteln. Zur detaillierten Analyse wurden Hydrophobizitätsplots der Vollängenvariante und der S2-Untereinheit des S-Proteins erstellt. Neben den bereits bekannten hydrophoben Regionen, wie dem Signalpeptid am N-Terminus und der Transmembrandomäne am C-terminalen Ende des Proteins, konnten in der S2-Untereinheit zunächst vier Fusionspeptidkandidaten (FP1-FP4) identifiziert werden (siehe Ergebnisse). Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden die Hydrophobizitätsplots der Fusionspeptidkandidaten mit denen bereits bekannter viraler Fusionspeptide von HIV und EboV verglichen (siehe Ergebnisse). Es ist gelungen, zwei geeignete Fusionspeptidkandidaten - FP1-1 und FP1-2 - zu identifizieren, die mehrheitlich alle Charakteristika für Fusionspeptide erfüllen. Nach Lage im viralen Fusionsprotein gehören sie zu den internen Fusionspeptiden wie die Fusionspeptide von EboV [102] und ASLV [103]. Beide Fusionspeptidkandidaten weisen eine Länge von höchstens 27 Aminosäuren auf und bestehen vorwiegend aus hydrophoben Resten wie Alanin (A), Glycin (G) und Phenylalanin (F). Die Hydrophobizitätswerte der Kandidaten bewegen sich im Bereich von $\Delta G = 2-6$ kcal/mol. Alle Fusionspeptidkandidaten weisen zudem einen für interne Fusionspeptide charakteristischen zentralen Prolinrest auf, der für die Interaktion mit der Zielmembran essentiell ist [116, , 117, , 118, , 119]. Nach Analyse der Sekundärstruktur kann festgestellt werden, dass die Fusionspeptidkandidaten FP1-1 und FP1-2 eine α -helikale Konformation einnehmen (siehe Ergebnisse).

E.5 Ausblick

Lysosomotrope Substanzen, Inhibitoren der Clathrin-abhängigen Endozytose und Cholesterol-entziehende Substanzen konnten die Infektivität von MHV-A59 deutlich beeinträchtigen. Es bedarf dennoch zusätzlicher Untersuchungen, so z.B. in welchem Maße gegebenenfalls Cytoskelettelemente wie Actin und Mikrotubuli am intrazellulären Transport der Virus-haltigen endozytotischen Vesikel beteiligt sind. Die Art des zellulären Organells, in welchem der eigentliche Fusionsprozess stattfindet, konnte noch nicht identifiziert werden. Der direkte Nachweis der Beteiligung von Clathrin-haltigen Vesikeln am Transport von MHV-A59 könnte mit Hilfe von EYFP-Clathrin erfolgen. Ungeklärt bleibt auch die Rolle des CEACAM1a-Rezeptors. Einige Untersuchungen zeigen, dass dieser lediglich für die Bindung, nicht aber für die Auslösung der Fusion von Bedeutung ist [226]. Andere Untersuchungen dagegen bestätigen eine direkte Beteiligung bei der Auslösung der Konformationsumwandlung im S-Protein von MHV [148, , 224, , 225]. Die Konformationsänderung im S-Protein von MHV-A59 konnte durch Erniedrigung des pH-Wertes ausgelöst werden und hatte sowohl den Verlust der Fusionsaktivität als auch der Infektivität zur Folge. Ungeklärt bleibt die Art der Konformationsumwandlung: (1) Erfolgt lediglich die Dissoziation der S1-Untereinheiten oder kommt es auch zu Veränderungen in der S2-Untereinheit? (2) Welcher Art sind die inter-/intramolekularen Wechselwirkungen, die durch die Erniedrigung des pH-Wertes verändert bzw. aufgehoben werden und welche Aminosäurereste sind daran beteiligt?

Die Auflösung der vorläufigen 3D-Struktur des S-Proteins von MHV-A59 bedarf weiterer Optimierung. Zusätzlich könnten S-CEACAM1a-Interaktionsstudien Aufschluss über die Lokalisierung der Rezeptorbindungsdomäne geben. Vergleiche mit bereits bekannten Strukturen viraler Fusionsproteine könnten zur Aufklärung des zugrunde liegenden Fusionsmechanismus beitragen. Die gravierenden Unterschiede zur bereits veröffentlichten 3D-Struktur des S-Proteins von SARS-CoV sollten im Detail analysiert werden. In diesem Zusammenhang stellt die kryoelektronenmikroskopische Analyse ungespaltener S-Proteine einen besonders wichtigen experimentellen Ansatz dar. Die 3D-Rekonstruktion ungespaltener S-Proteine könnte mit Hilfe der Virusvariante MHV-A59 FI angefertigt werden.

Nach theoretischer Identifizierung des Fusionspeptidkandidaten von MHV-A59 sollten experimentelle Untersuchungen mit entsprechenden synthetischen Peptiden durchgeführt werden. Zusätzlich könnten Mutationsstudien Aufschluss über die an der Fusion beteiligten Aminosäurereste liefern.

Die Fusionsaktivität des S-Proteins von SARS-CoV wird bestimmt durch: (1) S-ACE2-Rezeptor-Interaktion, (2) die proteolytische Spaltung in S1 und S2 und (3) einen niedrigen pH-Wert, bereitgestellt durch ein zelluläres Organell. Unklar bleibt die Rolle des niedrigen pH-Wertes.

Zusätzliche Untersuchungen sind notwendig, um zu evaluieren, in wie weit der pH-Wert sowohl für die Aktivität der Protease als auch für die Auslösung der Konformationsänderung/Fusionsreaktion verantwortlich ist. Kontroverse Ergebnisse zur pH-Abhängigkeit des viralen Eintritts von SARS-CoV erschweren die Untersuchungen zusätzlich. Mehrere Gruppen fanden keinen Einfluss lysosomotroper Substanzen auf die Infektivität von SARS-CoV [231] oder beobachteten Zell-Zell-Fusion unter neutralen pH-Bedingungen [156]. Andere Untersuchungen konnten eine pH-Abhängigkeit der viralen Infektivität von SARS-CoV nachweisen [168, , 169]. Auch die Rolle der endosomalen Proteasen bleibt weiterhin ungeklärt, da es auch zur Spaltung des S-Proteins in S1 und S2 unterschiedliche Daten gibt. Einige Publikationen zeigen eine posttranslationale Spaltung des S-Proteins [223, , 232], wogegen andere Gruppen keine Spaltung beobachten konnten [217].

Literaturverzeichnis

- [1] Marsh, M. und Helenius, A. (2006): Virus entry: open sesame, *Cell* (Band 124), Nr. 4, Seite 729-740.
- [2] Salonen, A.; Ahola, T. und Kaariainen, L. (2005): Viral RNA replication in association with cellular membranes, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 285), Seite 139-173.
- [3] Hogle, J. M. (2002): Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways, *Annu Rev Microbiol* (Band 56), Seite 677-702.
- [4] Chandran, K.; Sullivan, N. J.; Felbor, U.; Whelan, S. P. und Cunningham, J. M. (2005): Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection, *Science* (Band 308), Nr. 5728, Seite 1643-1645.
- [5] Qiu, Z.; Hingley, S. T.; Simmons, G.; Yu, C.; Das Sarma, J.; Bates, P. und Weiss, S. R. (2006): Endosomal proteolysis by cathepsins is necessary for murine coronavirus mouse hepatitis virus type 2 spike-mediated entry, *J Virol* (Band 80), Nr. 12, Seite 5768-5776.
- [6] Simmons, G.; Gosalia, D. N.; Rennekamp, A. J.; Reeves, J. D.; Diamond, S. L. und Bates, P. (2005): Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 33, Seite 11876-11881.
- [7] Mothes, W.; Boerger, A. L.; Narayan, S.; Cunningham, J. M. und Young, J. A. (2000): Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein, *Cell* (Band 103), Nr. 4, Seite 679-689.
- [8] Pelkmans, L.; Kartenbeck, J. und Helenius, A. (2001): Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER, *Nat Cell Biol* (Band 3), Nr. 5, Seite 473-483.
- [9] Marsh, M. und Bron, R. (1997): SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface, *J Cell Sci* (Band 110 (Pt 1)), Seite 95-103.
- [10] Dohner, K. und Sodeik, B. (2005): The role of the cytoskeleton during viral infection, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 285), Seite 67-108.
- [11] Marsh, M. und Helenius, A. (1989): Virus entry into animal cells, *Adv Virus Res* (Band 36), Seite 107-151.
- [12] Damico, R. L.; Crane, J. und Bates, P. (1998): Receptor-triggered membrane association of a model retroviral glycoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 5, Seite 2580-2585.
- [13] Hernandez, L. D.; Peters, R. J.; Delos, S. E.; Young, J. A.; Agard, D. A. und White, J. M. (1997): Activation of a retroviral membrane fusion protein: soluble receptor-induced liposome binding of the ALSV envelope glycoprotein, *J Cell Biol* (Band 139), Nr. 6, Seite 1455-1464.
- [14] Rust, M. J.; Lakadamyali, M.; Zhang, F. und Zhuang, X. (2004): Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry, *Nat Struct Mol Biol* (Band 11), Nr. 6, Seite 567-573.
- [15] Ehrlich, M.; Boll, W.; Van Oijen, A.; Hariharan, R.; Chandran, K.; Nibert, M. L. und Kirchhausen, T. (2004): Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits, *Cell* (Band 118), Nr. 5, Seite 591-605.
- [16] Kirkham, M.; Fujita, A.; Chadda, R.; Nixon, S. J.; Kurzchalia, T. V.; Sharma, D. K.; Pagano, R. E.; Hancock, J. F.; Mayor, S. und Parton, R. G. (2005): Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles, *J Cell Biol* (Band 168), Nr. 3, Seite 465-476.
- [17] Le Blanc, I.; Luyet, P. P.; Pons, V.; Ferguson, C.; Emans, N.; Petiot, A.; Mayran, N.; Demareux, N.; Faure, J.; Sadoul, R.; Parton, R. G. und Gruenberg, J. (2005): Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids, *Nat Cell Biol* (Band 7), Nr. 7, Seite 653-664.
- [18] Abrami, L.; Lindsay, M.; Parton, R. G.; Leppla, S. H. und van der Goot, F. G. (2004): Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway, *J Cell Biol* (Band 166), Nr. 5, Seite 645-651.
- [19] Anderson, H. A.; Chen, Y. und Norkin, L. C. (1996): Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae, *Mol Biol Cell* (Band 7), Nr. 11, Seite 1825-1834.
- [20] Kartenbeck, J.; Stukenbrok, H. und Helenius, A. (1989): Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol* (Band 109), Nr. 6 Pt 1, Seite 2721-2729.
- [21] Stang, E.; Kartenbeck, J. und Parton, R. G. (1997): Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae, *Mol Biol Cell* (Band 8), Nr. 1, Seite 47-57.
- [22] Coyne, C. B. und Bergelson, J. M. (2006): Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions, *Cell* (Band 124), Nr. 1, Seite 119-131.

- [23] Pietiainen, V. M.; Marjomaki, V.; Heino, J. und Hyypia, T. (2005): Viral entry, lipid rafts and caveosomes, *Ann Med* (Band 37), Nr. 6, Seite 394-403.
- [24] Sieczkarski, S. B. und Whittaker, G. R. (2002): Dissecting virus entry via endocytosis, *J Gen Virol* (Band 83), Nr. Pt 7, Seite 1535-1545.
- [25] Hofmann, H.; Geier, M.; Marzi, A.; Krumbiegel, M.; Peipp, M.; Fey, G. H.; Gramberg, T. und Pohlmann, S. (2004): Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 319), Nr. 4, Seite 1216-1221.
- [26] Sanchez-San Martin, C.; Lopez, T.; Arias, C. F. und Lopez, S. (2004): Characterization of rotavirus cell entry, *J Virol* (Band 78), Nr. 5, Seite 2310-2318.
- [27] Nash, T. C. und Buchmeier, M. J. (1996): Spike glycoprotein-mediated fusion in biliary glycoprotein-independent cell-associated spread of mouse hepatitis virus infection, *Virology* (Band 223), Nr. 1, Seite 68-78.
- [28] Nash, T. C. und Buchmeier, M. J. (1997): Entry of mouse hepatitis virus into cells by endosomal and nonendosomal pathways, *Virology* (Band 233), Nr. 1, Seite 1-8.
- [29] Katen, L. J.; Januszski, M. M.; Anderson, W. F.; Hasenkrug, K. J. und Evans, L. H. (2001): Infectious entry by amphotropic as well as ecotropic murine leukemia viruses occurs through an endocytic pathway, *J Virol* (Band 75), Nr. 11, Seite 5018-5026.
- [30] Mizzen, L.; Hilton, A.; Cheley, S. und Anderson, R. (1985): Attenuation of murine coronavirus infection by ammonium chloride, *Virology* (Band 142), Nr. 2, Seite 378-388.
- [31] Axelsson, M. A.; Karlsson, N. G.; Steel, D. M.; Ouwendijk, J.; Nilsson, T. und Hansson, G. C. (2001): Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins, *Glycobiology* (Band 11), Nr. 8, Seite 633-644.
- [32] Gallagher, T. M.; Escarmis, C. und Buchmeier, M. J. (1991): Alteration of the pH dependence of coronavirus-induced cell fusion: effect of mutations in the spike glycoprotein, *J Virol* (Band 65), Nr. 4, Seite 1916-1928.
- [33] Ohuchi, M.; Cramer, A.; Vey, M.; Ohuchi, R.; Garten, W. und Klenk, H. D. (1994): Rescue of vector-expressed fowl plague virus hemagglutinin in biologically active form by acidotropic agents and coexpressed M2 protein, *J Virol* (Band 68), Nr. 2, Seite 920-926.
- [34] Marsh, M. und Pelchen-Matthews, A. (2000): Endocytosis in viral replication, *Traffic* (Band 1), Nr. 7, Seite 525-532.
- [35] Sandvig, K.; Olsnes, S.; Petersen, O. W. und van Deurs, B. (1987): Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits, *J Cell Biol* (Band 105), Nr. 2, Seite 679-689.
- [36] Droese, S. und Altendorf, K. (1997): Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases, *J Exp Biol* (Band 200), Nr. Pt 1, Seite 1-8.
- [37] Bayer, N.; Schober, D.; Prchla, E.; Murphy, R. F.; Blaas, D. und Fuchs, R. (1998): Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection, *J Virol* (Band 72), Nr. 12, Seite 9645-9655.
- [38] Blanchard, E.; Belouzard, S.; Goueslain, L.; Wakita, T.; Dubuisson, J.; Wychowski, C. und Rouille, Y. (2006): Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis, *J Virol* (Band 80), Nr. 14, Seite 6964-6972.
- [39] Glomb-Reinmund, S. und Kielian, M. (1998): The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus, *Virology* (Band 248), Nr. 2, Seite 372-381.
- [40] Perez, L. und Carrasco, L. (1994): Involvement of the vacuolar H(+)-ATPase in animal virus entry, *J Gen Virol* (Band 75 (Pt 10)), Seite 2595-2606.
- [41] Tscherne, D. M.; Jones, C. T.; Evans, M. J.; Lindenbach, B. D.; McKeating, J. A. und Rice, C. M. (2006): Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry, *J Virol* (Band 80), Nr. 4, Seite 1734-1741.
- [42] Vlasak, M.; Goesler, I. und Blaas, D. (2005): Human rhinovirus type 89 variants use heparan sulfate proteoglycan for cell attachment, *J Virol* (Band 79), Nr. 10, Seite 5963-5970.
- [43] Yonezawa, A.; Cavois, M. und Greene, W. C. (2005): Studies of ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: involvement of cytoskeletal proteins and enhancement by tumor necrosis factor alpha, *J Virol* (Band 79), Nr. 2, Seite 918-926.
- [44] Diaz-Griffero, F.; Jackson, A. P. und Brojatsch, J. (2005): Cellular uptake of avian leukosis virus subgroup B is mediated by clathrin, *Virology* (Band 337), Nr. 1, Seite 45-54.
- [45] Sieczkarski, S. B. und Whittaker, G. R. (2002): Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis, *J Virol* (Band 76), Nr. 20, Seite 10455-10464.

- [46] Sun, X.; Yau, V. K.; Briggs, B. J. und Whittaker, G. R. (2005): Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells, *Virology* (Band 338), Nr. 1, Seite 53-60.
- [47] Wang, L. H.; Rothberg, K. G. und Anderson, R. G. (1993): Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation, *J Cell Biol* (Band 123), Nr. 5, Seite 1107-1117.
- [48] Nash, T. C.; Gallagher, T. M. und Buchmeier, M. J. (1995): MHVR-independent cell-cell spread of mouse hepatitis virus infection requires neutral pH fusion, *Adv Exp Med Biol* (Band 380), Seite 351-357.
- [49] Niemann, H.; Boschek, B.; Evans, D.; Rosing, M.; Tamura, T. und Klenk, H. D. (1982): Post-translational glycosylation of coronavirus glycoprotein E1: inhibition by monensin, *Embo J* (Band 1), Nr. 12, Seite 1499-1504.
- [50] Yu, G. Y. und Lai, M. M. (2005): The ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of murine coronavirus from endosome to cytoplasm during virus entry, *J Virol* (Band 79), Nr. 1, Seite 644-648.
- [51] Denison, M. R.; Kim, J. C. und Ross, T. (1995): Inhibition of coronavirus MHV-A59 replication by proteinase inhibitors, *Adv Exp Med Biol* (Band 380), Seite 391-397.
- [52] Choi, K. S.; Aizaki, H. und Lai, M. M. (2005): Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release, *J Virol* (Band 79), Nr. 15, Seite 9862-9871.
- [53] Chu, J. J. und Ng, M. L. (2004): Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway, *J Virol* (Band 78), Nr. 19, Seite 10543-10555.
- [54] Thorp, E. B. und Gallagher, T. M. (2004): Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry, *J Virol* (Band 78), Nr. 6, Seite 2682-2692.
- [55] Smith, A. E. und Helenius, A. (2004): How viruses enter animal cells, *Science* (Band 304), Nr. 5668, Seite 237-242.
- [56] Pelkmans, L. und Helenius, A. (2003): Insider information: what viruses tell us about endocytosis, *Curr Opin Cell Biol* (Band 15), Nr. 4, Seite 414-422.
- [57] Nawa, M.; Takasaki, T.; Yamada, K.; Kurane, I. und Akatsuka, T. (2003): Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine, *J Gen Virol* (Band 84), Nr. Pt 7, Seite 1737-1741.
- [58] Matlin, K. S.; Reggio, H.; Helenius, A. und Simons, K. (1981): Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line, *J Cell Biol* (Band 91), Nr. 3 Pt 1, Seite 601-613.
- [59] Hofmann, H.; Hattermann, K.; Marzi, A.; Gramberg, T.; Geier, M.; Krumbiegel, M.; Kuate, S.; Uberla, K.; Niedrig, M. und Pohlmann, S. (2004): S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients, *J Virol* (Band 78), Nr. 12, Seite 6134-6142.
- [60] Huss, M.; Ingenhorst, G.; Konig, S.; Gassel, M.; Droese, S.; Zeeck, A.; Altendorf, K. und Wieczorek, H. (2002): Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 43, Seite 40544-40548.
- [61] Rodal, S. K.; Skretting, G.; Garred, O.; Vilhardt, F.; van Deurs, B. und Sandvig, K. (1999): Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles, *Mol Biol Cell* (Band 10), Nr. 4, Seite 961-974.
- [62] Earp, L. J.; Delos, S. E.; Park, H. E. und White, J. M. (2005): The many mechanisms of viral membrane fusion proteins, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 285), Seite 25-66.
- [63] Chan, D. C. und Kim, P. S. (1998): HIV entry and its inhibition, *Cell* (Band 93), Nr. 5, Seite 681-684.
- [64] Sodroski, J. G. (1999): HIV-1 entry inhibitors in the side pocket, *Cell* (Band 99), Nr. 3, Seite 243-246.
- [65] Weissenhorn, W.; Hinz, A. und Gaudin, Y. (2007): Virus membrane fusion, *FEBS Lett*.
- [66] Heinz, F. X. und Allison, S. L. (2001): The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes, *Curr Opin Microbiol* (Band 4), Nr. 4, Seite 450-455.
- [67] Lescar, J.; Roussel, A.; Wien, M. W.; Navaza, J.; Fuller, S. D.; Wengler, G.; Wengler, G. und Rey, F. A. (2001): The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH, *Cell* (Band 105), Nr. 1, Seite 137-148.
- [68] Chen, J.; Lee, K. H.; Steinhauer, D. A.; Stevens, D. J.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1998): Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation, *Cell* (Band 95), Nr. 3, Seite 409-417.
- [69] Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu Rev Biochem* (Band 69), Seite 531-569.
- [70] Carr, C. M. und Kim, P. S. (1993): A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin, *Cell* (Band 73), Nr. 4, Seite 823-832.

- [71] Weissenhorn, W.; Dessen, A.; Calder, L. J.; Harrison, S. C.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1999): Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses, *Mol Membr Biol* (Band 16), Nr. 1, Seite 3-9.
- [72] Baker, K. A.; Dutch, R. E.; Lamb, R. A. und Jardetzky, T. S. (1999): Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion, *Mol Cell* (Band 3), Nr. 3, Seite 309-319.
- [73] Weissenhorn, W.; Calder, L. J.; Wharton, S. A.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1998): The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 11, Seite 6032-6036.
- [74] Weissenhorn, W.; Carfi, A.; Lee, K. H.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1998): Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain, *Mol Cell* (Band 2), Nr. 5, Seite 605-616.
- [75] Weissenhorn, W.; Dessen, A.; Harrison, S. C.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1997): Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41, *Nature* (Band 387), Nr. 6631, Seite 426-430.
- [76] Kielian, M. und Rey, F. A. (2006): Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin, *Nat Rev Microbiol* (Band 4), Nr. 1, Seite 67-76.
- [77] Lamb, R. A.; Paterson, R. G. und Jardetzky, T. S. (2006): Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures, *Virology* (Band 344), Nr. 1, Seite 30-37.
- [78] Heldwein, E. E.; Lou, H.; Bender, F. C.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J. und Harrison, S. C. (2006): Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1, *Science* (Band 313), Nr. 5784, Seite 217-220.
- [79] Roche, S.; Bressanelli, S.; Rey, F. A. und Gaudin, Y. (2006): Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G, *Science* (Band 313), Nr. 5784, Seite 187-191.
- [80] Allison, S. L.; Schlich, J.; Stiasny, K.; Mandl, C. W.; Kunz, C. und Heinz, F. X. (1995): Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH, *J Virol* (Band 69), Nr. 2, Seite 695-700.
- [81] Rey, F. A.; Heinz, F. X.; Mandl, C.; Kunz, C. und Harrison, S. C. (1995): The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution, *Nature* (Band 375), Nr. 6529, Seite 291-298.
- [82] Ahn, A.; Gibbons, D. L. und Kielian, M. (2002): The fusion peptide of Semliki Forest virus associates with sterol-rich membrane domains, *J Virol* (Band 76), Nr. 7, Seite 3267-3275.
- [83] Levine, A.J. (1993) Das Influenza-A-Virus. und in: *Viren: Diebe, Mörder und Piraten*. Spektrum Akademischer Verlag, 184 (1993): Das Influenza-A-Virus, Spektrum Akademischer Verlag.
- [84] White, J. M. (1992): Membrane fusion, *Science* (Band 258), Nr. 5084, Seite 917-924.
- [85] Wiley, D. C. und Skehel, J. J. (1987): The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus, *Annu Rev Biochem* (Band 56), Seite 365-394.
- [86] Puri, A.; Booy, F. P.; Doms, R. W.; White, J. M. und Blumenthal, R. (1990): Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment, *J Virol* (Band 64), Nr. 8, Seite 3824-3832.
- [87] Wilson, I. A.; Skehel, J. J. und Wiley, D. C. (1981): Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, *Nature* (Band 289), Nr. 5796, Seite 366-373.
- [88] Stuart, D. (1994): Virus structure. Docking mission accomplished, *Nature* (Band 371), Nr. 6492, Seite 19-20.
- [89] Huang, Q.; Opitz, R.; Knapp, E. W. und Herrmann, A. (2002): Protonation and stability of the globular domain of influenza virus hemagglutinin, *Biophys J* (Band 82), Nr. 2, Seite 1050-1058.
- [90] Bottcher, C.; Ludwig, K.; Herrmann, A.; van Heel, M. und Stark, H. (1999): Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy, *FEBS Lett* (Band 463), Nr. 3, Seite 255-259.
- [91] Godley, L.; Pfeifer, J.; Steinhauer, D.; Ely, B.; Shaw, G.; Kaufmann, R.; Suchanek, E.; Pabo, C.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. und et al. (1992): Introduction of intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza hemagglutinin abolishes membrane fusion activity, *Cell* (Band 68), Nr. 4, Seite 635-645.
- [92] Kemble, G. W.; Bodian, D. L.; Rose, J.; Wilson, I. A. und White, J. M. (1992): Intermonomer disulfide bonds impair the fusion activity of influenza virus hemagglutinin, *J Virol* (Band 66), Nr. 8, Seite 4940-4950.
- [93] Ludwig, K. (2000): Die dreidimensionale Struktur des Influenzavirus-Hämagglutinin im membranfusionsaktiven Zustand
Dissertation.
- [94] Spruce, A. E.; Iwata, A. und Almers, W. (1991): The first milliseconds of the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during membrane fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 9, Seite 3623-3627.

- [95] Earp, L. J.; Hernandez, L. D.; Delos, S. E. und White, J. M. (2003): Receptor-activated binding of viral fusion proteins to target membranes, *Methods Enzymol* (Band 372), Seite 428-440.
- [96] Eckert, D. M. und Kim, P. S. (2001): Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition, *Annu Rev Biochem* (Band 70), Seite 777-810.
- [97] Blumenthal, R.; Sarkar, D. P.; Durell, S.; Howard, D. E. und Morris, S. J. (1996): Dilation of the influenza hemagglutinin fusion pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events, *J Cell Biol* (Band 135), Nr. 1, Seite 63-71.
- [98] Markovic, I.; Leikina, E.; Zhukovsky, M.; Zimmerberg, J. und Chernomordik, L. V. (2001): Synchronized activation and refolding of influenza hemagglutinin in multimeric fusion machines, *J Cell Biol* (Band 155), Nr. 5, Seite 833-844.
- [99] Markovic, I.; Pulyaeva, H.; Sokoloff, A. und Chernomordik, L. V. (1998): Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates, *J Cell Biol* (Band 143), Nr. 5, Seite 1155-1166.
- [100] Danieli, T.; Pelletier, S. L.; Henis, Y. I. und White, J. M. (1996): Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers, *J Cell Biol* (Band 133), Nr. 3, Seite 559-569.
- [101] Matsuyama, S.; Delos, S. E. und White, J. M. (2004): Sequential roles of receptor binding and low pH in forming prehairpin and hairpin conformations of a retroviral envelope glycoprotein, *J Virol* (Band 78), Nr. 15, Seite 8201-8209.
- [102] Gallaher, W. R. (1996): Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and avian sarcoma viruses, *Cell* (Band 85), Nr. 4, Seite 477-478.
- [103] Hernandez, L. D. und White, J. M. (1998): Mutational analysis of the candidate internal fusion peptide of the avian leukosis and sarcoma virus subgroup A envelope glycoprotein, *J Virol* (Band 72), Nr. 4, Seite 3259-3267.
- [104] Gomara, M. J.; Mora, P.; Mingarro, I. und Nieva, J. L. (2004): Roles of a conserved proline in the internal fusion peptide of Ebola glycoprotein, *FEBS Lett* (Band 569), Nr. 1-3, Seite 261-266.
- [105] Gallaher, W. R.; Ball, J. M.; Garry, R. F.; Griffin, M. C. und Montelaro, R. C. (1989): A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses, *AIDS Res Hum Retroviruses* (Band 5), Nr. 4, Seite 431-440.
- [106] Peisajovich, S. G. und Shai, Y. (2003): Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion, *Biochim Biophys Acta* (Band 1614), Nr. 1, Seite 122-129.
- [107] Rafalski, M.; Ortiz, A.; Rockwell, A.; van Ginkel, L. C.; Lear, J. D.; DeGrado, W. F. und Wilschut, J. (1991): Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: interaction of HA2 N-terminal peptides with phospholipid vesicles, *Biochemistry* (Band 30), Nr. 42, Seite 10211-10220.
- [108] Sainz, B., Jr.; Rausch, J. M.; Gallaher, W. R.; Garry, R. F. und Wimley, W. C. (2005): Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein, *J Virol* (Band 79), Nr. 11, Seite 7195-7206.
- [109] Bosch, M. L.; Earl, P. L.; Fargnoli, K.; Picciafuoco, S.; Giombini, F.; Wong-Staal, F. und Franchini, G. (1989): Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses, *Science* (Band 244), Nr. 4905, Seite 694-697.
- [110] Freed, E. O.; Myers, D. J. und Risser, R. (1990): Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 12, Seite 4650-4654.
- [111] White, J.; Kielian, M. und Helenius, A. (1983): Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses, *Q Rev Biophys* (Band 16), Nr. 2, Seite 151-195.
- [112] Gallaher, W. R. (1987): Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus, *Cell* (Band 50), Nr. 3, Seite 327-328.
- [113] Horvath, C. M. und Lamb, R. A. (1992): Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion, *J Virol* (Band 66), Nr. 4, Seite 2443-2455.
- [114] Durell, S. R.; Martin, I.; Ruyschaert, J. M.; Shai, Y. und Blumenthal, R. (1997): What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review), *Mol Membr Biol* (Band 14), Nr. 3, Seite 97-112.
- [115] Pritsker, M.; Rucker, J.; Hoffman, T. L.; Doms, R. W. und Shai, Y. (1999): Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes, *Biochemistry* (Band 38), Nr. 35, Seite 11359-11371.
- [116] Ruiz-Arguello, M. B.; Goni, F. M.; Pereira, F. B. und Nieva, J. L. (1998): Phosphatidylinositol-dependent membrane fusion induced by a putative fusogenic sequence of Ebola virus, *J Virol* (Band 72), Nr. 3, Seite 1775-1781.

- [117] Delos, S. E.; Gilbert, J. M. und White, J. M. (2000): The central proline of an internal viral fusion peptide serves two important roles, *J Virol* (Band 74), Nr. 4, Seite 1686-1693.
- [118] Hernandez, L. D.; Hoffman, L. R.; Wolfsberg, T. G. und White, J. M. (1996): Virus-cell and cell-cell fusion, *Annu Rev Cell Dev Biol* (Band 12), Seite 627-661.
- [119] Ito, H.; Watanabe, S.; Sanchez, A.; Whitt, M. A. und Kawaoka, Y. (1999): Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein, *J Virol* (Band 73), Nr. 10, Seite 8907-8912.
- [120] Martin, I. und Ruyschaert, J. M. (2000): Common properties of fusion peptides from diverse systems, *Biosci Rep* (Band 20), Nr. 6, Seite 483-500.
- [121] Martin, I. I.; Ruyschaert, J. und Epand, R. M. (1999): Role of the N-terminal peptides of viral envelope proteins in membrane fusion, *Adv Drug Deliv Rev* (Band 38), Nr. 3, Seite 233-255.
- [122] White, J. M. (1990): Viral and cellular membrane fusion proteins, *Annu Rev Physiol* (Band 52), Seite 675-697.
- [123] Skehel, J. J.; Cross, K.; Steinhauer, D. und Wiley, D. C. (2001): Influenza fusion peptides, *Biochem Soc Trans* (Band 29), Nr. Pt 4, Seite 623-626.
- [124] Garry, R. F. und Dash, S. (2003): Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins, *Virology* (Band 307), Nr. 2, Seite 255-265.
- [125] Heinz, F. X. und Allison, S. L. (2003): Flavivirus structure and membrane fusion, *Adv Virus Res* (Band 59), Seite 63-97.
- [126] Tamm, L. K. und Han, X. (2000): Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes, *Biosci Rep* (Band 20), Nr. 6, Seite 501-518.
- [127] Tamm, L. K.; Han, X.; Li, Y. und Lai, A. L. (2002): Structure and function of membrane fusion peptides, *Biopolymers* (Band 66), Nr. 4, Seite 249-260.
- [128] Han, X.; Bushweller, J. H.; Cafiso, D. S. und Tamm, L. K. (2001): Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin, *Nat Struct Biol* (Band 8), Nr. 8, Seite 715-720.
- [129] Qiao, H.; Armstrong, R. T.; Melikyan, G. B.; Cohen, F. S. und White, J. M. (1999): A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype, *Mol Biol Cell* (Band 10), Nr. 8, Seite 2759-2769.
- [130] Li, Y.; Han, X.; Lai, A. L.; Bushweller, J. H.; Cafiso, D. S. und Tamm, L. K. (2005): Membrane structures of the hemifusion-inducing fusion peptide mutant G1S and the fusion-blocking mutant G1V of influenza virus hemagglutinin suggest a mechanism for pore opening in membrane fusion, *J Virol* (Band 79), Nr. 18, Seite 12065-12076.
- [131] Kamath, S. und Wong, T. C. (2002): Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation, *Biophys J* (Band 83), Nr. 1, Seite 135-143.
- [132] Jeffers, S. A.; Sanders, D. A. und Sanchez, A. (2002): Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein, *J Virol* (Band 76), Nr. 24, Seite 12463-12472.
- [133] Fredericksen, B. L. und Whitt, M. A. (1995): Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity, *J Virol* (Band 69), Nr. 3, Seite 1435-1443.
- [134] Allison, S. L.; Schlich, J.; Stiasny, K.; Mandl, C. W. und Heinz, F. X. (2001): Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E, *J Virol* (Band 75), Nr. 9, Seite 4268-4275.
- [135] Duffus, W. A.; Levy-Mintz, P.; Klimjack, M. R. und Kielian, M. (1995): Mutations in the putative fusion peptide of Semliki Forest virus affect spike protein oligomerization and virus assembly, *J Virol* (Band 69), Nr. 4, Seite 2471-2479.
- [136] Freed, E. O.; Delwart, E. L.; Buchschacher, G. L., Jr. und Panganiban, A. T. (1992): A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 1, Seite 70-74.
- [137] Gething, M. J.; Doms, R. W.; York, D. und White, J. (1986): Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus, *J Cell Biol* (Band 102), Nr. 1, Seite 11-23.
- [138] Schoch, C. und Blumenthal, R. (1993): Role of the fusion peptide sequence in initial stages of influenza hemagglutinin-induced cell fusion, *J Biol Chem* (Band 268), Nr. 13, Seite 9267-9274.
- [139] Gunther-Ausborn, S.; Schoen, P.; Bartoldus, I.; Wilschut, J. und Stegmann, T. (2000): Role of hemagglutinin surface density in the initial stages of influenza virus fusion: lack of evidence for cooperativity, *J Virol* (Band 74), Nr. 6, Seite 2714-2720.
- [140] Kliger, Y.; Aharoni, A.; Rapaport, D.; Jones, P.; Blumenthal, R. und Shai, Y. (1997): Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell Fusion. Structure-function study, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 21, Seite 13496-13505.

- [141] Pereira, F. B.; Goni, F. M. und Nieva, J. L. (1995): Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution, *FEBS Lett* (Band 362), Nr. 2, Seite 243-246.
- [142] Gledhill, A. W. und Andrewes, C. H. (1951): A hepatitis virus of mice, *Br J Exp Pathol* (Band 32), Nr. 6, Seite 559-568.
- [143] Manaker, R. A.; Piczak, C. V.; Miller, A. A. und Stanton, M. F. (1961): A hepatitis virus complicating studies with mouse leukemia, *J Natl Cancer Inst* (Band 27), Seite 29-51.
- [144] Stadler, K.; Masignani, V.; Eickmann, M.; Becker, S.; Abrignani, S.; Klenk, H. D. und Rappuoli, R. (2003): SARS--beginning to understand a new virus, *Nat Rev Microbiol* (Band 1), Nr. 3, Seite 209-218.
- [145] Kooi, C.; Cervin, M. und Anderson, R. (1991): Differentiation of acid-pH-dependent and -nondependent entry pathways for mouse hepatitis virus, *Virology* (Band 180), Nr. 1, Seite 108-119.
- [146] Holmes, K. V.; Zelus, B. D.; Schickli, J. H. und Weiss, S. R. (2001): Receptor specificity and receptor-induced conformational changes in mouse hepatitis virus spike glycoprotein, *Adv Exp Med Biol* (Band 494), Seite 173-181.
- [147] Matsuyama, S. und Taguchi, F. (2002): Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein, *J Virol* (Band 76), Nr. 23, Seite 11819-11826.
- [148] Zelus, B. D.; Schickli, J. H.; Blau, D. M.; Weiss, S. R. und Holmes, K. V. (2003): Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 degrees C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8, *J Virol* (Band 77), Nr. 2, Seite 830-840.
- [149] Miura, H. S.; Nakagaki, K. und Taguchi, F. (2004): N-terminal domain of the murine coronavirus receptor CEACAM1 is responsible for fusogenic activation and conformational changes of the spike protein, *J Virol* (Band 78), Nr. 1, Seite 216-223.
- [150] Taguchi, F. und Matsuyama, S. (2002): Soluble receptor potentiates receptor-independent infection by murine coronavirus, *J Virol* (Band 76), Nr. 3, Seite 950-958.
- [151] Frana, M. F.; Behnke, J. N.; Sturman, L. S. und Holmes, K. V. (1985): Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion, *J Virol* (Band 56), Nr. 3, Seite 912-920.
- [152] de Haan, C. A.; Stadler, K.; Godeke, G. J.; Bosch, B. J. und Rottier, P. J. (2004): Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion, *J Virol* (Band 78), Nr. 11, Seite 6048-6054.
- [153] Krzystyniak, K. und Dupuy, J. M. (1984): Entry of mouse hepatitis virus 3 into cells, *J Gen Virol* (Band 65 (Pt 1)), Seite 227-231.
- [154] Bosch, B. J.; van der Zee, R.; de Haan, C. A. und Rottier, P. J. (2003): The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex, *J Virol* (Band 77), Nr. 16, Seite 8801-8811.
- [155] Song, H. C.; Seo, M. Y.; Stadler, K.; Yoo, B. J.; Choo, Q. L.; Coates, S. R.; Uematsu, Y.; Harada, T.; Greer, C. E.; Polo, J. M.; Pileri, P.; Eickmann, M.; Rappuoli, R.; Abrignani, S.; Houghton, M. und Han, J. H. (2004): Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein, *J Virol* (Band 78), Nr. 19, Seite 10328-10335.
- [156] Li, W.; Moore, M. J.; Vasilieva, N.; Sui, J.; Wong, S. K.; Berne, M. A.; Somasundaran, M.; Sullivan, J. L.; Luzuriaga, K.; Greenough, T. C.; Choe, H. und Farzan, M. (2003): Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus, *Nature* (Band 426), Nr. 6965, Seite 450-454.
- [157] Bos, E. C.; Luytjes, W. und Spaan, W. J. (1997): The function of the spike protein of mouse hepatitis virus strain A59 can be studied on virus-like particles: cleavage is not required for infectivity, *J Virol* (Band 71), Nr. 12, Seite 9427-9433.
- [158] Hingley, S. T.; Leparac-Goffart, I.; Seo, S. H.; Tsai, J. C. und Weiss, S. R. (2002): The virulence of mouse hepatitis virus strain A59 is not dependent on efficient spike protein cleavage and cell-to-cell fusion, *J Neurovirol* (Band 8), Nr. 5, Seite 400-410.
- [159] Xu, Y.; Liu, Y.; Lou, Z.; Qin, L.; Li, X.; Bai, Z.; Pang, H.; Tien, P.; Gao, G. F. und Rao, Z. (2004): Structural basis for coronavirus-mediated membrane fusion. Crystal structure of mouse hepatitis virus spike protein fusion core, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 29, Seite 30514-30522.
- [160] Xu, Y.; Zhu, J.; Liu, Y.; Lou, Z.; Yuan, F.; Cole, D. K.; Ni, L.; Su, N.; Qin, L.; Li, X.; Bai, Z.; Bell, J. I.; Pang, H.; Tien, P.; Gao, G. F. und Rao, Z. (2004): Characterization of the heptad repeat regions, HR1 and HR2, and design of a fusion core structure model of the spike protein from severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus, *Biochemistry* (Band 43), Nr. 44, Seite 14064-14071.

- [161] McGinnes, L. W.; Sergel, T.; Chen, H.; Hamo, L.; Schwertz, S.; Li, D. und Morrison, T. G. (2001): Mutational analysis of the membrane proximal heptad repeat of the newcastle disease virus fusion protein, *Virology* (Band 289), Nr. 2, Seite 343-352.
- [162] Tripet, B.; Howard, M. W.; Jobling, M.; Holmes, R. K.; Holmes, K. V. und Hodges, R. S. (2004): Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core, *J Biol Chem* (Band 2), Seite 2.
- [163] Xu, Y.; Lou, Z.; Liu, Y.; Pang, H.; Tien, P.; Gao, G. F. und Rao, Z. (2004): Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 47, Seite 49414-49419.
- [164] Xu, Y.; Su, N.; Qin, L.; Bai, Z.; Gao, G. F. und Rao, Z. (2004): Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the heptad-repeat complex of SARS coronavirus spike protein, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (Band 60), Nr. Pt 12 Pt 2, Seite 2377-2379.
- [165] Beniac, D. R.; Andonov, A.; Grudski, E. und Booth, T. F. (2006): Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike, *Nat Struct Mol Biol* (Band 13), Nr. 8, Seite 751-752.
- [166] Wu, X. D.; Shang, B.; Yang, R. F.; Yu, H.; Ma, Z. H.; Shen, X.; Ji, Y. Y.; Lin, Y.; Wu, Y. D.; Lin, G. M.; Tian, L.; Gan, X. Q.; Yang, S.; Jiang, W. H.; Dai, E. H.; Wang, X. Y.; Jiang, H. L.; Xie, Y. H.; Zhu, X. L.; Pei, G.; Li, L.; Wu, J. R. und Sun, B. (2004): The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells, *Cell Res* (Band 14), Nr. 5, Seite 400-406.
- [167] Guillen, J.; Perez-Berna, A. J.; Moreno, M. R. und Villalain, J. (2005): Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: implications for the viral fusion mechanism, *J Virol* (Band 79), Nr. 3, Seite 1743-1752.
- [168] Simmons, G.; Reeves, J. D.; Rennekamp, A. J.; Amberg, S. M.; Piefer, A. J. und Bates, P. (2004): Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 12, Seite 4240-4245.
- [169] Yang, Z. Y.; Huang, Y.; Ganesh, L.; Leung, K.; Kong, W. P.; Schwartz, O.; Subbarao, K. und Nabel, G. J. (2004): pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN, *J Virol* (Band 78), Nr. 11, Seite 5642-5650.
- [170] Liu, S.; Xiao, G.; Chen, Y.; He, Y.; Niu, J.; Escalante, C. R.; Xiong, H.; Farmar, J.; Debnath, A. K.; Tien, P. und Jiang, S. (2004): Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors, *Lancet* (Band 363), Nr. 9413, Seite 938-947.
- [171] Hofmann, H. und Pohlmann, S. (2004): Cellular entry of the SARS coronavirus, *Trends Microbiol* (Band 12), Nr. 10, Seite 466-472.
- [172] Hakansson-McReynolds, S.; Jiang, S.; Rong, L. und Caffrey, M. (2006): Solution structure of the severe acute respiratory syndrome-coronavirus heptad repeat 2 domain in the prefusion state, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 17, Seite 11965-11971.
- [173] Xiao, X.; Chakraborti, S.; Dimitrov, A. S.; Gramatikoff, K. und Dimitrov, D. S. (2003): The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 312), Nr. 4, Seite 1159-1164.
- [174] Bosch, B. J.; Martina, B. E.; Van Der Zee, R.; Lepault, J.; Haijema, B. J.; Versluis, C.; Heck, A. J.; De Groot, R.; Osterhaus, A. D. und Rottier, P. J. (2004): Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 22, Seite 8455-8460.
- [175] Yoo, D. W.; Parker, M. D. und Babiuk, L. A. (1991): The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells, *Virology* (Band 180), Nr. 1, Seite 395-399.
- [176] Luo, Z. und Weiss, S. R. (1998): Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein, *Virology* (Band 244), Nr. 2, Seite 483-494.
- [177] Luo, Z. L. und Weiss, S. R. (1998): Mutational analysis of fusion peptide-like regions in the mouse hepatitis virus strain A59 spike protein, *Adv Exp Med Biol* (Band 440), Seite 17-23.
- [178] Colotto, A. und Epand, R. M. (1997): Structural study of the relationship between the rate of membrane fusion and the ability of the fusion peptide of influenza virus to perturb bilayers, *Biochemistry* (Band 36), Nr. 25, Seite 7644-7651.
- [179] Pereira, F. B.; Goni, F. M. und Nieva, J. L. (1997): Membrane fusion induced by the HIV type 1 fusion peptide: modulation by factors affecting glycoprotein 41 activity and potential anti-HIV compounds, *AIDS Res Hum Retroviruses* (Band 13), Nr. 14, Seite 1203-1211.

- [180] Pereira, F. B.; Valpuesta, J. M.; Basanez, G.; Goni, F. M. und Nieva, J. L. (1999): Interbilayer lipid mixing induced by the human immunodeficiency virus type-1 fusion peptide on large unilamellar vesicles: the nature of the nonlamellar intermediates, *Chem Phys Lipids* (Band 103), Nr. 1-2, Seite 11-20.
- [181] Wimley, W. C. und White, S. H. (1996): Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces, *Nat Struct Biol* (Band 3), Nr. 10, Seite 842-848.
- [182] Luo, Z.; Matthews, A. M. und Weiss, S. R. (1999): Amino acid substitutions within the leucine zipper domain of the murine coronavirus spike protein cause defects in oligomerization and the ability to induce cell-to-cell fusion, *J Virol* (Band 73), Nr. 10, Seite 8152-8159.
- [183] Sturman, L. S. und Takemoto, K. K. (1972): Enhanced growth of a murine coronavirus in transformed mouse cells, *Infect Immun* (Band 6), Nr. 4, Seite 501-507.
- [184] Tsai, J. C.; Zelus, B. D.; Holmes, K. V. und Weiss, S. R. (2003): The N-terminal domain of the murine coronavirus spike glycoprotein determines the CEACAM1 receptor specificity of the virus strain, *J Virol* (Band 77), Nr. 2, Seite 841-850.
- [185] Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* (Band 72), Seite 248-254.
- [186] Böttcher, C.J.F.; Van Gent, C.M. und Pries, C. (1961): A rapid sensitive submicrophosphorus determination *Anal Chim Acta* (Band 24), Seite 203-204.
- [187] Bligh, E. G. und Dyer, W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol* (Band 37), Nr. 8, Seite 911-917.
- [188] van Heel, M.; Harauz, G.; Orlova, E. V.; Schmidt, R. und Schatz, M. (1996): A new generation of the IMAGIC image processing system, *J Struct Biol* (Band 116), Nr. 1, Seite 17-24.
- [189] Van Heel, M. (1987): Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction, *Ultramicroscopy* (Band 21), Nr. 2, Seite 111-123.
- [190] van Heel, M. und Stoffler-Meilicke, M. (1985): Characteristic views of *E. coli* and *B. stearothermophilus* 30S ribosomal subunits in the electron microscope, *Embo J* (Band 4), Nr. 9, Seite 2389-2395.
- [191] van Heel, M. (1989): Classification of very large electron microscopical image data sets, *Optik* (Band 82), Seite 114-126.
- [192] Dodge, J. T.; Mitchell, C. und Hanahan, D. J. (1963): The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes, *Arch Biochem Biophys* (Band 100), Seite 119-130.
- [193] Hoekstra, D.; de Boer, T.; Klappe, K. und Wilschut, J. (1984): Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes, *Biochemistry* (Band 23), Nr. 24, Seite 5675-5681.
- [194] Korte, T.; Ludwig, K.; Booy, F. P.; Blumenthal, R. und Herrmann, A. (1999): Conformational intermediates and fusion activity of influenza virus hemagglutinin, *J Virol* (Band 73), Nr. 6, Seite 4567-4574.
- [195] Blumenthal, R.; Bali-Puri, A.; Walter, A.; Covell, D. und Eidelman, O. (1987): pH-dependent fusion of vesicular stomatitis virus with Vero cells. Measurement by dequenching of octadecyl rhodamine fluorescence, *J Biol Chem* (Band 262), Nr. 28, Seite 13614-13619.
- [196] S. Jaysinghe, K. Hristova, W. Wimley, C. Snider, and S. H. White (2006): Mpex-Software.
- [197] Sturman, L. S.; Holmes, K. V. und Behnke, J. (1980): Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid, *J Virol* (Band 33), Nr. 1, Seite 449-462.
- [198] Helenius, A.; Marsh, M. und White, J. (1982): Inhibition of Semliki forest virus penetration by lysosomotropic weak bases, *J Gen Virol* (Band 58 Pt 1), Seite 47-61.
- [199] Popik, W.; Alce, T. M. und Au, W. C. (2002): Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells, *J Virol* (Band 76), Nr. 10, Seite 4709-4722.
- [200] Guyader, M.; Kiyokawa, E.; Abrami, L.; Turelli, P. und Trono, D. (2002): Role for human immunodeficiency virus type 1 membrane cholesterol in viral internalization, *J Virol* (Band 76), Nr. 20, Seite 10356-10364.
- [201] Subtil, A.; Gaidarov, I.; Kobylarz, K.; Lampson, M. A.; Keen, J. H. und McGraw, T. E. (1999): Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 96), Nr. 12, Seite 6775-6780.
- [202] Huang, I. C.; Bosch, B. J.; Li, W.; Farzan, M.; Rottier, P. M. und Choe, H. (2006): SARS-CoV, but not HCoV-NL63, utilizes cathepsins to infect cells: viral entry, *Adv Exp Med Biol* (Band 581), Seite 335-338.

- [203] van Genderen, I. und van Meer, G. (1995): Differential targeting of glucosylceramide and galactosylceramide analogues after synthesis but not during transcytosis in Madin-Darby canine kidney cells, *J Cell Biol* (Band 131), Nr. 3, Seite 645-654.
- [204] Chang, K. W.; Sheng, Y. und Gombold, J. L. (2000): Coronavirus-induced membrane fusion requires the cysteine-rich domain in the spike protein, *Virology* (Band 269), Nr. 1, Seite 212-224.
- [205] Ye, R.; Montalto-Morrison, C. und Masters, P. S. (2004): Genetic analysis of determinants for spike glycoprotein assembly into murine coronavirus virions: distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain, *J Virol* (Band 78), Nr. 18, Seite 9904-9917.
- [206] Agirre, A.; Flach, C.; Goni, F. M.; Mendelsohn, R.; Valpuesta, J. M.; Wu, F. und Nieva, J. L. (2000): Interactions of the HIV-1 fusion peptide with large unilamellar vesicles and monolayers. A cryo-TEM and spectroscopic study, *Biochim Biophys Acta* (Band 1467), Nr. 1, Seite 153-164.
- [207] Nieva, J. L.; Nir, S.; Muga, A.; Goni, F. M. und Wilschut, J. (1994): Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage, *Biochemistry* (Band 33), Nr. 11, Seite 3201-3209.
- [208] Suarez, T.; Gomara, M. J.; Goni, F. M.; Mingarro, I.; Muga, A.; Perez-Paya, E. und Nieva, J. L. (2003): Calcium-dependent conformational changes of membrane-bound Ebola fusion peptide drive vesicle fusion, *FEBS Lett* (Band 535), Nr. 1-3, Seite 23-28.
- [209] David-Ferreira, J. F. und Manaker, R. A. (1965): An Electron Microscope Study of the Development of a Mouse Hepatitis Virus in Tissue Culture Cells, *J Cell Biol* (Band 24), Seite 57-78.
- [210] Phillips, J. J.; Chua, M. M.; Lavi, E. und Weiss, S. R. (1999): Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence, *J Virol* (Band 73), Nr. 9, Seite 7752-7760.
- [211] Ferreira, L.; Villar, E. und Munoz-Barroso, I. (2004): Conformational changes of Newcastle disease virus envelope glycoproteins triggered by gangliosides, *Eur J Biochem* (Band 271), Nr. 3, Seite 581-588.
- [212] Schoch, C.; Blumenthal, R. und Clague, M. J. (1992): A long-lived state for influenza virus-erythrocyte complexes committed to fusion at neutral pH, *FEBS Lett* (Band 311), Nr. 3, Seite 221-225.
- [213] Chu, V. C.; McElroy, L. J.; Chu, V.; Bauman, B. E. und Whittaker, G. R. (2006): The avian coronavirus infectious bronchitis virus undergoes direct low-pH-dependent fusion activation during entry into host cells, *J Virol* (Band 80), Nr. 7, Seite 3180-3188.
- [214] Xiao, X.; Feng, Y.; Chakraborti, S. und Dimitrov, D. S. (2004): Oligomerization of the SARS-CoV S glycoprotein: dimerization of the N-terminus and trimerization of the ectodomain, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 322), Nr. 1, Seite 93-99.
- [215] Spaan, W.; Cavanagh, D. und Horzinek, M. C. (1988): Coronaviruses: structure and genome expression, *J Gen Virol* (Band 69 (Pt 12)), Seite 2939-2952.
- [216] Stauber, R.; Pfeleiderer, M. und Siddell, S. (1993): Proteolytic cleavage of the murine coronavirus surface glycoprotein is not required for its fusion activity, *Adv Exp Med Biol* (Band 342), Seite 165-170.
- [217] Xiao, X. und Dimitrov, D. S. (2004): The SARS-CoV S glycoprotein, *Cell Mol Life Sci* (Band 61), Nr. 19-20, Seite 2428-2430.
- [218] Li, F.; Berardi, M.; Li, W.; Farzan, M.; Dormitzer, P. R. und Harrison, S. C. (2006): Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain, *J Virol* (Band 80), Nr. 14, Seite 6794-6800.
- [219] Skehel, J. J.; Bayley, P. M.; Brown, E. B.; Martin, S. R.; Waterfield, M. D.; White, J. M.; Wilson, I. A. und Wiley, D. C. (1982): Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 79), Nr. 4, Seite 968-972.
- [220] Matsuyama, S.; Ujike, M.; Morikawa, S.; Tashiro, M. und Taguchi, F. (2005): Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 35, Seite 12543-12547.
- [221] Huang, I. C.; Bosch, B. J.; Li, F.; Li, W.; Lee, K. H.; Ghiran, S.; Vasilieva, N.; Dermody, T. S.; Harrison, S. C.; Dormitzer, P. R.; Farzan, M.; Rottier, P. J. und Choe, H. (2006): SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 6, Seite 3198-3203.
- [222] Delmas, B. und Laude, H. (1990): Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression, *J Virol* (Band 64), Nr. 11, Seite 5367-5375.

- [223] Du, L.; Kao, R. Y.; Zhou, Y.; He, Y.; Zhao, G.; Wong, C.; Jiang, S.; Yuen, K. Y.; Jin, D. Y. und Zheng, B. J. (2007): Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 359), Nr. 1, Seite 174-179.
- [224] Sturman, L. S.; Ricard, C. S. und Holmes, K. V. (1990): Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37 degrees C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion, *J Virol* (Band 64), Nr. 6, Seite 3042-3050.
- [225] Weismiller, D. G.; Sturman, L. S.; Buchmeier, M. J.; Fleming, J. O. und Holmes, K. V. (1990): Monoclonal antibodies to the peplomer glycoprotein of coronavirus mouse hepatitis virus identify two subunits and detect a conformational change in the subunit released under mild alkaline conditions, *J Virol* (Band 64), Nr. 6, Seite 3051-3055.
- [226] de Haan, C. A.; Li, Z.; Te Lintelo, E.; Bosch, B. J.; Haijema, B. J. und Rottier, P. J. (2005): Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor, *J Virol* (Band 79), Nr. 22, Seite 14451-14456.
- [227] Akula, S. M.; Naranatt, P. P.; Walia, N. S.; Wang, F. Z.; Fegley, B. und Chandran, B. (2003): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis, *J Virol* (Band 77), Nr. 14, Seite 7978-7990.
- [228] Asanaka, M. und Lai, M. M. (1993): Cell fusion studies identified multiple cellular factors involved in mouse hepatitis virus entry, *Virology* (Band 197), Nr. 2, Seite 732-741.
- [229] Yokomori, K.; Asanaka, M.; Stohlman, S. A. und Lai, M. M. (1993): A spike protein-dependent cellular factor other than the viral receptor is required for mouse hepatitis virus entry, *Virology* (Band 196), Nr. 1, Seite 45-56.
- [230] Sainz, B., Jr.; Rausch, J. M.; Gallaher, W. R.; Garry, R. F. und Wimley, W. C. (2005): The aromatic domain of the coronavirus class I viral fusion protein induces membrane permeabilization: putative role during viral entry, *Biochemistry* (Band 44), Nr. 3, Seite 947-958.
- [231] Han, D. P.; Kim, H. G.; Kim, Y. B.; Poon, L. L. und Cho, M. W. (2004): Development of a safe neutralization assay for SARS-CoV and characterization of S-glycoprotein, *Virology* (Band 326), Nr. 1, Seite 140-149.
- [232] Wu, C. Y.; Jan, J. T.; Ma, S. H.; Kuo, C. J.; Juan, H. F.; Cheng, Y. S.; Hsu, H. H.; Huang, H. C.; Wu, D.; Brik, A.; Liang, F. S.; Liu, R. S.; Fang, J. M.; Chen, S. T.; Liang, P. H. und Wong, C. H. (2004): Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 101), Nr. 27, Seite 10012-10017.